



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Los factores inducidos por hipoxia modulan el fenotipo troncal y la malignidad de células de cáncer de colon jugando papeles opuestos en la regulación de la vía de señalización Wnt canónica

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Paula Guadalupe Santoyo Ramos

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Martha Robles Flores.

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos. Facultad de Química, UNAM

Dr. Ángel Zaráin Herzberg. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, UNAM

MÉXICO, D.F. FEBRERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

When I Heard the Learn'd Astronomer

When I heard the learn'd astronomer,
When the proofs, the figures, were ranged in columns before me,
When I was shown the charts and the diagrams, to add, divide, and
measure them,
When I, sitting, heard the astronomer, where he lectured with much
applause in the lecture-room,
How soon, unaccountable, I became tired and sick;
Till rising and gliding out, I wander'd off by myself,
In the mystical moist night-air, and from time to time,
Look'd up in perfect silence at the stars.

Walt Whitman, 1819 – 1892

CONTENIDO

Resumen

Prefacio

Introducción

Vía de señalización Wnt

Células troncales cancerosas en el cáncer de colon

Factores transcripcionales regulados por hipoxia

Regulación de los factores HIF α de manera dependiente de oxígeno

Regulación de los factores HIF α de manera independiente de oxígeno

HIF y su papel en el cáncer

HIF-1 α vs. HIF-2 α

Comunicación entre la vía Wnt y la actividad de los factores HIF α

Planteamiento del problema

Hipótesis y objetivos

Materiales y métodos

Resultados

La expresión de HIF-1 α e HIF-2 α se incrementa en células de cáncer de colon

El silenciamiento de HIF-1 α disminuye la producción de lactato.

El silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α incrementa la respuesta apoptótica

El silenciamiento de HIF-1 α afecta la migración y quimiotaxis mediada por CXCR4.

El silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α disminuye la actividad tumorigénica *in vivo*.

El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α producen efectos opuestos en la vía Wnt.

La expresión de CD44, Oct4, CD24 o CK-20 cambia tras el silenciamiento de HIF α .

Discusión

Conclusiones generales

Publicaciones y artículo para obtención de grado

Bibliografía

Resumen

En este estudio se examinó el papel de los factores transcripcionales inducidos por hipoxia (HIF) en el mantenimiento del fenotipo maligno y la actividad de la vía de señalización Wnt canónica. Bajo normoxia, tanto HIF-1 α como HIF-2 α se expresan en distintas líneas celulares de cáncer de colon, pero no en su contraparte no maligna. El bloqueo estable de la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α disminuyó la producción de lactato, la tasa de apoptosis, la capacidad migratoria, la quimiotaxis mediada por CXCR4 y la actividad tumorigénica. Sin embargo, el silenciamiento de cada uno tuvo efectos opuestos en la actividad transcripcional mediada por β -catenina en células de cáncer de colon con distintos "fondos genéticos". En células con la vía Wnt constitutivamente activa el silenciamiento de HIF-2 α no tiene efecto sobre la expresión de β -catenina pero indujo el incremento en su actividad transcripcional y su acumulación en el núcleo. En cambio, la disminución en la expresión de HIF-1 α afectó negativamente la estabilidad y la transcripción mediada de β -catenina induciendo su salida del núcleo y favoreciendo su translocación a la membrana plasmática colocalizando con E-caderina. La depleción de HIF-1 α revirtió la transición epitelio-mesénquima e incrementó la expresión de E-caderina (la forma activa de 120 kDa), disminuyó la expresión de la proteína de citoesqueleto intermedio vimentina y del factor transcripcional Snail 1 y la expresión de los marcadores asociados al fenotipo troncal CD44 y Oct4 pero incrementó la expresión de los marcadores asociados al fenotipo diferenciado CD24 y CK20. En cambio, la depleción del factor HIF-2 α indujo la reorganización de la red de vimentina y la localización subcelular de Snail 1, incrementó la expresión de los marcadores CD44 y Oct4, y disminuyó la expresión de CD24 y CK20. El silenciamiento de HIF-2 α incrementó la actividad transcripcional de β -catenina bajo condiciones de hipoxia en células cancerosas que presentan una vía de señalización Wnt canónica no alterada, lo cual sugiere que este factor modula negativamente la vía de señalización Wnt en el cáncer de colon. Tomando en consideración todo lo anterior, los resultados presentados en este trabajo sugieren que los factores transcripcionales HIF α juegan papeles opuestos en la vía de señalización Wnt con consecuencias sobre la transición epitelio-mesénquima.

RECONOCIMIENTOS

El presente estudio de doctorado se realizó bajo la tutoría de la Dra. Martha Robles Flores en el edificio de investigación de la Facultad de Medicina, UNAM. Fue apoyado por la UNAM (Proyecto DGAPA-UNAM IN226111 y IN215514) y CONACYT (CONACYT CB2011-151731).

A la Dra Martha Robles Flores por su apoyo en el diseño y desarrollo del presente proyecto.

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos.

Dr. Ángel Zaráin Herzberg

Y a los miembros de jurado de examen:

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Dra. María Antonieta Chávez González

Dra. Elizabeth Langley McCarron

Dr. Fernando López Casillas

Por todos sus comentarios que enriquecieron el contenido de este trabajo.

A la Dra. Cristina Castañeda Patlán por su apoyo técnico

Al Dr. Daniel Chung, Cancer Center, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA, por la donación de los plásmidos usados en este proyecto

Al Dr. Enrique Pedernera y la M. en C. María José Gómora Herrera del departamento de Embriología en la Facultad de Medicina, UNAM, por su ayuda con el uso del microscopio confocal y la toma de imágenes.

Al Dr. Alejandro Zentella-Dehesa y el Veterinario Octavio Villanueva por su ayuda en la obtención y manejo de los ratones inmunocomprometidos.

A la Dra. Vilma Maldonado del INMEGEN por la autenticación de las líneas celulares usadas en este trabajo.

ANTECEDENTES

El tracto intestinal de los mamíferos está formado por una monocapa de células epiteliales organizadas en una estructura bidimensional plegada en valles, crestas e invaginaciones denominadas criptas de Lieberkühn, figura 1. Las células epiteliales del colon se renuevan continuamente a partir de células troncales que residen en la base de estas criptas. Las células troncales originan células hijas que migran hacia arriba después de experimentar dos o tres ciclos de división celular. En las crestas, se diferencian en linajes de absorción (enterocitos) o en células secretoras de hormonas o mucus (Figura 1, células caliciformes o enteroendócrinas), y al alcanzar el extremo de las crestas intestinales las células degeneran por apoptosis. La evidencia experimental indica que la ruta de señalización Wnt (caja 1) controla la homeostasis en este epitelio, y que cuando está alterada se produce cáncer [1].

Vía de señalización Wnt

Los tumores colorectales son una de las neoplasias más frecuentes y en aproximadamente un 90% de los casos hay mutaciones en proteínas que traducen las señales generadas por los ligandos Wnt. Los genes *Wnt* codifican para un grupo altamente conservado, en todos los metazoarios, de glicoproteínas ricas en cisteína y modificadas por palmitoilación. Una vez secretados, los ligandos Wnt interaccionan con un complejo de receptores formado por un

Caja 1. Identificación y asignación de nombre a los genes *Wnt*

El protooncogene *Wnt1* se identificó buscando genes activados, en células germinales de ratón, tras la inserción de MMTV (por sus siglas en inglés Mouse Mammary Tumour Virus) y recibió el nombre de *int1* (por integration site 1). La incapacidad técnica para aislar o producir la proteína producto de ese gene favoreció el análisis genético y el hallazgo de genes relacionados en *Drosophila melanogaster* involucrados en el desarrollo embrionario: *Wingless* (su mutación generaba moscas sin alas) y *Armadillo* (por su patrón de expresión durante el desarrollo embrionario). En 1987 *Wingless* fue clonado presentando el mismo mapa de restricción que el gen *int1*, identificándolos como genes homólogos. En 1990, durante la búsqueda de más sitios de inserción para MMTV en el genoma del ratón, se identificaron otros genes no relacionadas con *int1*, entonces la nomenclatura resultó confusa y se propuso el nombre híbrido Wnt (por Wingless-related integration site) para los genes de la familia *int1/Wingless*. *int1* recibiría el nombre de *Wnt1* como miembro fundador [2].

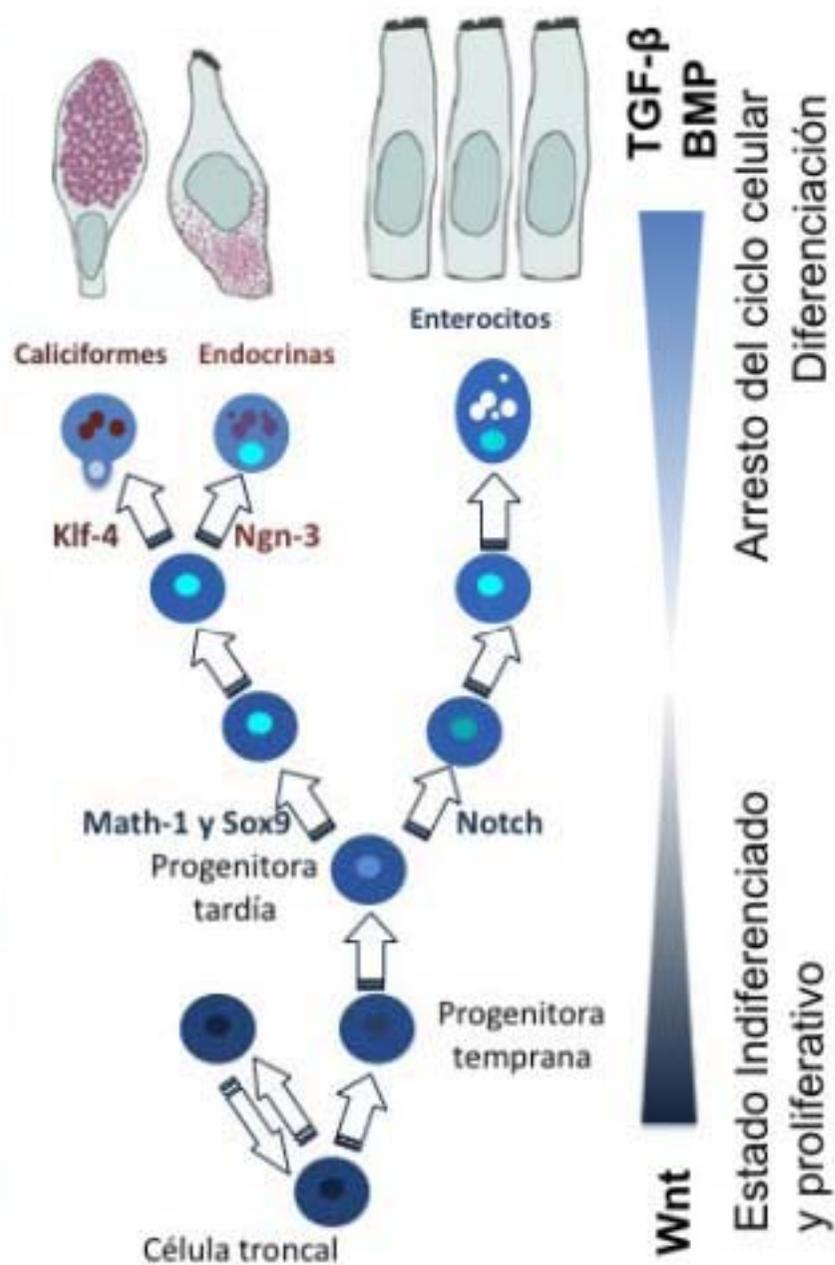
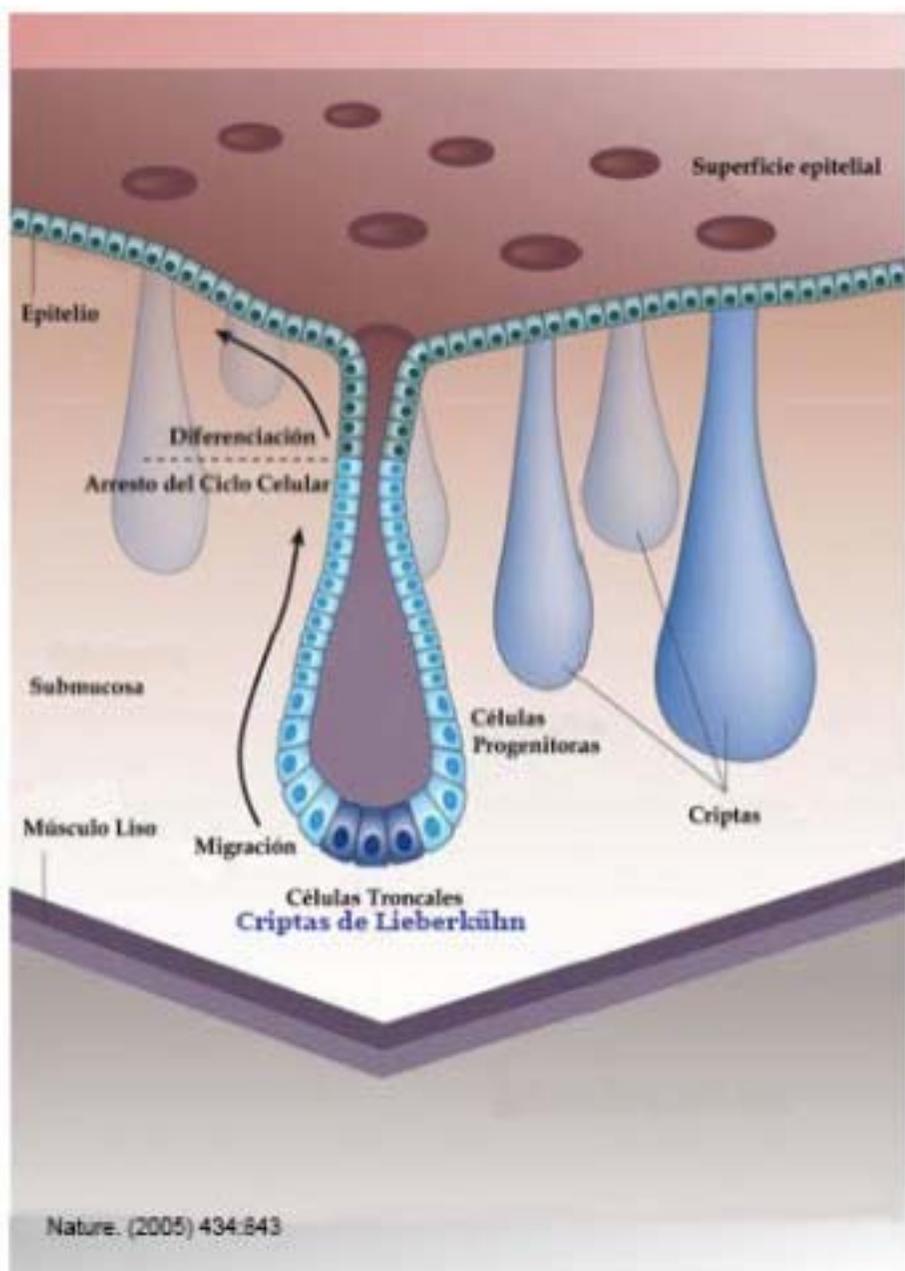


Figura 1. Epitelio intestinal. El epitelio intestinal se forma durante la gastrulación. Permanece como epitelio cuboidal estratificado hasta la mitad de la gestación. La organización básica se establece a través de interacciones epitelio-mesenquimales: la arquitectura del epitelio (derivado de endodermo) es inducida por señales generadas por el mesénquima (derivado del mesodermo). En las criptas se localizan células troncales que originan progenitoras de los linajes de absorción o secreción. La expresión de factores transcripcionales regula la diferenciación a linajes específicos. Las progenitoras del linaje de secreción son dirigidas por Math-1 y Sox9. Klf-4 a las células globet, Ngn-3 a las células enteroendocrinas y Notch dirige el establecimiento y maduración del linaje de absorción. La vía Wnt es importante para el mantenimiento del linaje secretor, pero son las señales generadas por BMP (por las siglas del inglés Bone Morphogenic Protein) quienes dirigen su maduración [3].

miembro de la familia de receptores Frizzled de siete dominios transmembranales de y la proteína relacionada con receptores de lipoproteínas de baja densidad (LRP 5/6). En la ruta Wnt canónica (figura 2), en ausencia de ligando Wnt, β -catenina es degradada. Un complejo de proteínas el cual incluye a Axina, el supresor tumoral APC (por sus siglas en inglés, Adenomatous Polyposis Coli), y dos cinasas, la Glucógeno Sintasa Cinasa-3 β (GSK-3 β) y la Caseína Cinasa 1 α (CK1 α) median la fosforilación secuencial de β -catenina marcándola a poliubiquitinación por β -TRCP1 o β -TRCP2, del complejo E3 ubiquitin ligasa, para ser degradada vía proteosoma (caja 2).

Caja 2. Características generales del Proteasoma

El proteasoma es un complejo de multisubunidades que contiene una partícula central catalítica (CP) y dos partículas reguladoras (RPs). Las RPs se asocian a la CP en orientaciones opuestas y le confieren especificidad de reconocimiento al complejo. Unen a proteínas poliubiquitinadas (quitan las ubiquitinas para reciclarlas), para después desnaturalizar y translocar las proteínas al interior del CP. La CP consiste en cuatro anillos heptaméricos asociados axialmente (dos anillos α externos y dos anillos β internos) que están constituidos por siete subunidades α y β . De las siete subunidades que forman el anillo β interno, tres de ellas (β 1, β 2 y β 5) contienen residuos de treonina catalíticos en su porción N-terminal con actividad de hidrolasa N-terminal nucleofílica que rompen enlaces peptídicos. β 1, β 2 y β 5 presentan actividades tipo caspasa, tripsina y quimotripsina, respectivamente, que rompen enlaces peptídicos en residuos de aa post-acidos, básicos e hidrofóbicos [7].

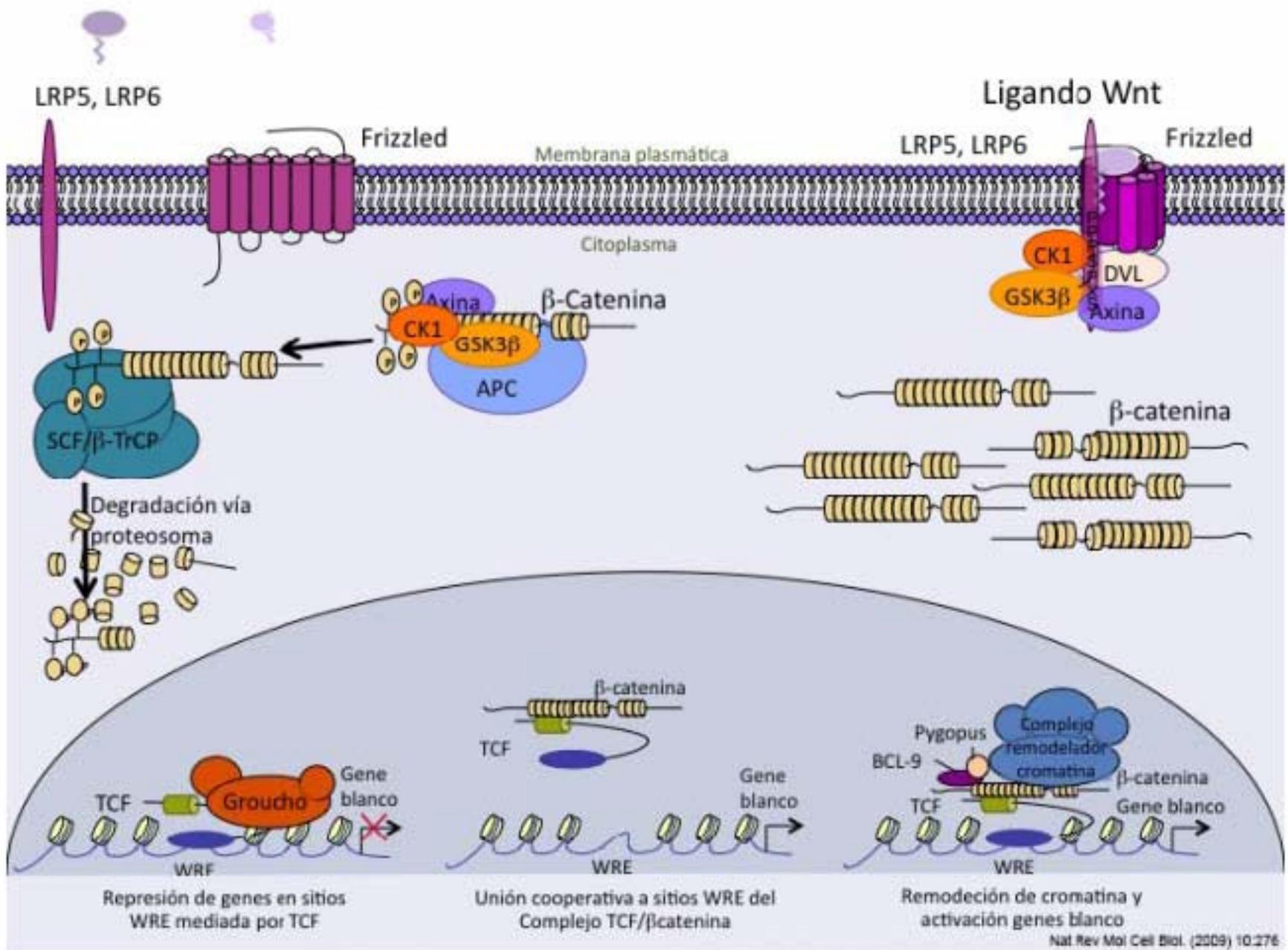


Figura 2. Vía de señalización Wnt. La vía de señalización Wnt canónica y los niveles de expresión de la proteína β -catenina son regulados por el complejo de degradación en respuesta a la ausencia o presencia de ligandos Wnt. LRP5/6, Low-density lipoprotein receptor-related protein; CK1, Casein Kinase 1; GSK-3 β , Glycogen synthase kinase 3; APC, Adenomatous Polyposis Coli protein; DVL, Segment polarity protein dishevelled homolog; SCF/ β TrCP, Skp, Cullin, F-box containing complex/ β -transducin repeat containing; TCF, T- cell factor; BCL-9, B-cell CLL/lymphoma 9 protein; WRE, Wnt-responsive element.

La unión del ligando Wnt al complejo de receptores Frizzled-LRP5/6 desestabiliza el complejo de degradación, permitiendo la acumulación de β -catenina en el citosol y su translocación al núcleo. En el núcleo, β -catenina interacciona con los miembros de la familia de factores de transcripción TCF/LEF (por sus siglas en inglés T Cell Factor /Lymphoid Enhancer Factor), para formar un complejo bipartito activo que regula el programa transcripcional Wnt, figura 2 [1, 4-6]. Este programa está involucrado en proliferación al promover la transcripción de genes tales como c-Myc y Ciclina D1 [5]. El protooncogene c-Myc (caja 3), es uno de los principales blancos de la vía Wnt en líneas celulares de cáncer de colon [8] y en el epitelio de las criptas intestinales tras la delección de APC *in vivo* [9].

En la homeostasis intestinal, c-Myc es esencial en la formación de las criptas intestinales y se asocia con el mantenimiento de las células troncales [10]. c-Myc es un factor transcripcional que regula más del 20% del genoma, actúa como un regulador global de transcripción para genes involucrados en apoptosis, ciclo celular, metabolismo, biogénesis ribosomal, síntesis de proteínas, función mitocondrial, adhesión celular, reparación de DNA y angiogénesis. Todo lo anterior indica que la vía de señalización Wnt y su regulación sobre la actividad transcripcional mediada por β -catenina/TCF se asocian al mantenimiento del fenotipo troncal normal en el colon, pero toma otra relevancia al estar implicados tanto en el establecimiento, progresión y el desarrollo del cáncer [8].

Caja 3. Descubrimiento del gen MYC

El gen MYC fue descubierto en pacientes diagnosticados con linfoma de Burkitt. En esta neoplasia las células tumorales muestran translocación cromosómica, que muchas veces involucra al cromosoma 8, t(8;14)(q24;q32). Al clonar el punto de ruptura de la fusión de los cromosomas se identificó un gen semejante al oncogene viral de la mielocitomatosis (v-Myc), por lo que el nuevo gen celular recibió el nombre de c-Myc [12].

Células troncales cancerosas en el cáncer de colon.

Distintos estudios permitieron elucidar la presencia de células troncales cancerosas (caja 4) en los tumores con la habilidad exclusiva de regenerar tumores [11]. Estas células tienen características en común con las células troncales normales, incluyendo la capacidad de autorrenovación y de originar linajes diferenciados [6]. Además, generan clones *in vitro* y tumores en ratones inmunodeficientes, y recapitulan las características del tumor original. En el caso del colon, se identificaron células iniciadoras del cáncer [13-14], y se demostró que el cáncer colorectal es originado y propagado por un pequeño número de células no diferenciadas tumorigénicas que expresan los marcadores CD34, CD44, CD133, Lgr5 y la actividad transcripcional mediada por β -catenina [15].

Caja 4. Células troncales cancerosas.

El concepto de “célula troncal cancerosa” se propuso por primera vez hace más de 150 años. En 1985, al analizar las semejanzas histológicas entre tejidos de teratocarcinomas y de fetos en desarrollo se sugirió una posible relación entre ellos. La identificación de tipos celulares embrionarios en tumores cancerosos y la descripción de procesos de diferenciación espontáneos en teratocarcinomas malignos y neuroblastomas hacia células benignas maduras dio sustento a esa hipótesis. Actualmente, en el cáncer de colon, distintos marcadores de superficie y funciones celulares se asocian con el fenotipo troncal [16]:

CD34. Sialomucina, de un solo pase transmembranal, involucrada en la regulación de la proliferación y diferenciación tanto de células troncales como de progenitoras. También regula de la adhesión al substrato. Fue descrita por primera vez buscando progenitoras hematopoyéticas en el cordón umbilical.

CD44. Glicoproteína, de un solo pase transmembranal, involucrada en regular la agregación celular, en retener la matriz pericelular, en la señalización inducida por matriz extracelular y la migración. Fue descrita analizando los mecanismos de asociación célula-célula mediados por el ácido hialurónico.

CD133. Glicoproteína, de cinco pases transmembranales, involucrada en la supervivencia celular, polaridad celular y mantenimiento del fenotipo troncal. Fue descrita durante estudios de neurogénesis y de los procesos de división asimétrica en células neuroepiteliales.

Lgr5. Receptor para la R-espondina, de siete pases transmembranales acoplado a proteína G, involucrado en la regulación y el mantenimiento del fenotipo troncal de las células columnares en la cripta del colon. La familia de genes *LGR* fue identificada por análisis *in silico* para cDNA homólogos al receptor tipo A para glicoproteínas con actividad hormonal.

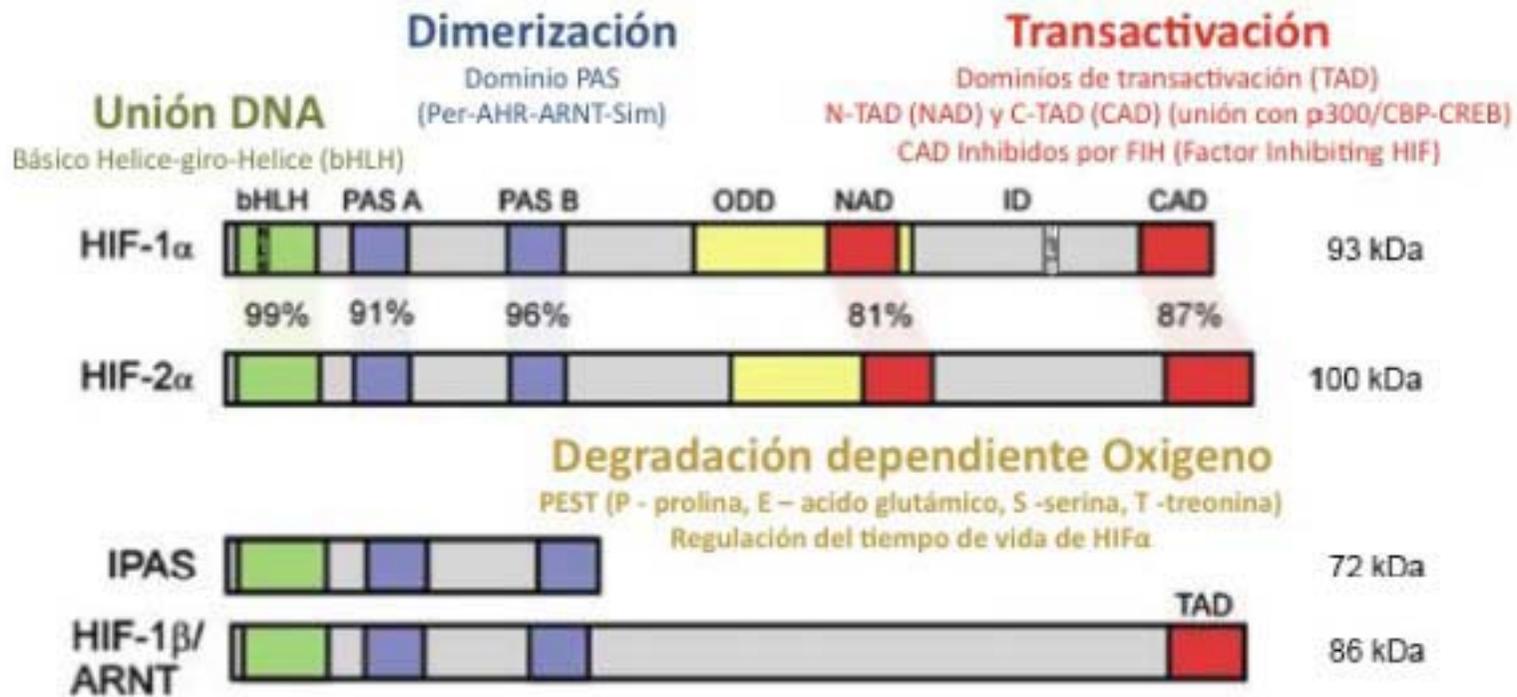
Normalmente las células troncales residen en microambientes especializados que regulan su función. Estudios de cultivo *in vitro* bajo condiciones hipòxicas mostraron una relación entre la disponibilidad de O₂ y el fenotipo troncal y precursor. Aunque algunas células troncales son perivasculares, otras ocupan nichos hipòxicos y pueden ser reguladas por gradientes de O₂ [16-18].

Uno de los principales sensores de cambios en la concentración de oxígeno son los factores transcripcionales inducidos por hipoxia, HIF. Las rutas de señalización que regulan la actividad de los factores HIF tienen influencia en la adaptación metabólica, eritropoiesis, angiogénesis, crecimiento, diferenciación celular, sobrevivencia y apoptosis siendo críticos tanto en el desarrollo como en la fisiología de tumores malignos [19, 21].

Factores transcripcionales regulados por hipoxia

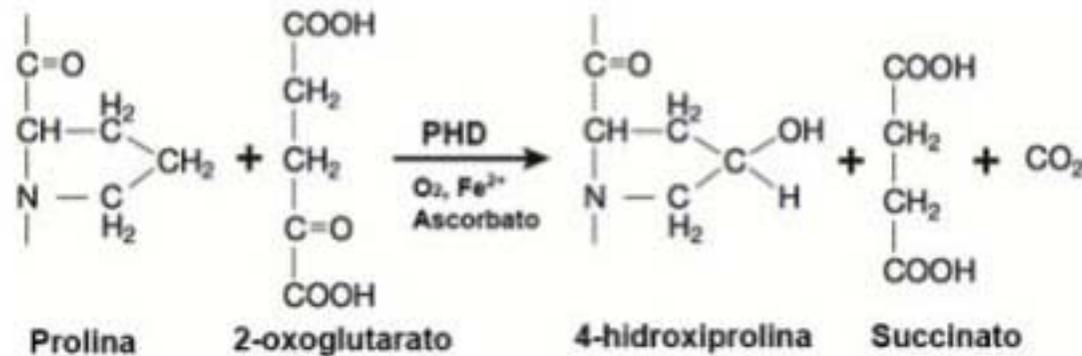
Los factores HIF son mediadores esenciales de las rutas de señalización sensibles a oxígeno en la célula. Las rutas de señalización que regulan la actividad de los factores HIF tienen influencia en la adaptación metabólica, eritropoiesis, angiogénesis, tono vascular, crecimiento, diferenciación celular, sobrevivencia, apoptosis y tanto en el desarrollo como en la fisiología de tumores cancerosos [19-21]. HIF es un factor de transcripción heterodimérico compuesto de dos proteínas (subunidades α y β) de tipo hélice-giro-hélice de la familia PAS (homólogo a Per-Arnt-Sim), figura 3. En mamíferos existen tres genes que codifican a las subunidades HIF α : HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α . Las tres subunidades alfa están codificadas en diferentes *locus* y bajo la regulación de diferentes promotores. Se sabe que HIF-1 α y HIF-2 α son funcionales, mientras que el papel fisiológico de HIF-3 α no se conoce del todo [22-24]. Las subunidades alfa se transcriben y se traducen de manera constitutiva, pero su vida media y su estabilidad dependen de la disponibilidad de oxígeno en la célula [23]. Las subunidades alfa contienen un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) que controla su estabilidad y degradación, al igual que dos dominios de transactivación CAD (dominio transactivación C-terminal) y NAD (dominio transactivación N-terminal), figura 3 [24]. La subunidad HIF-1 β (ARNT) también cuenta con tres isoformas funcionales las cuales son proteínas nucleares

HIF. Proteínas de tipo hélice-giro-hélice de la familia PAS



Cell Death Differ. (2008)15:642

Reacción de hidroxilación catalizada por PHD en residuos de Prolina



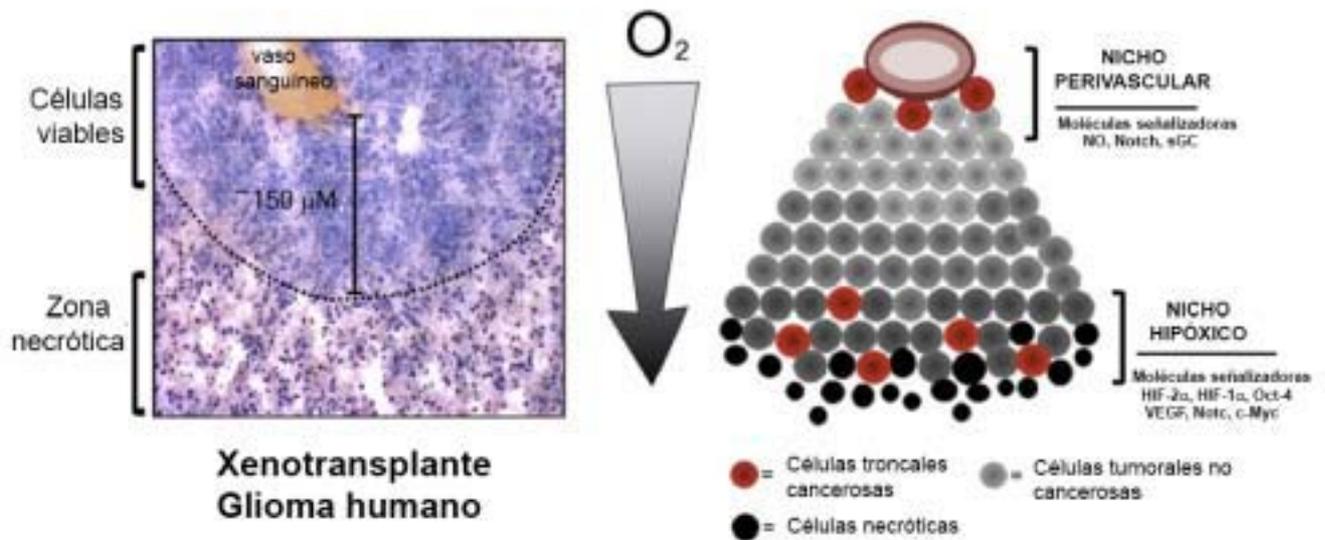
EMBO Rep. (2006) 7:41

Figura 3. Estructura y regulación de la actividad de los factores HIF. *Panel superior.* Se señalan los dominios y en algunos casos el porcentaje de identidad entre ellos: dominio de unión al DNA (bHLH), dominio de dimerización (PAS), dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), dominio de transactivación N-terminal (NAD) y el dominio de transactivación C-terminal (CAD). *Panel inferior.* Reacción de hidroxilación catalizada por las prolihdroxilasas, PDH.

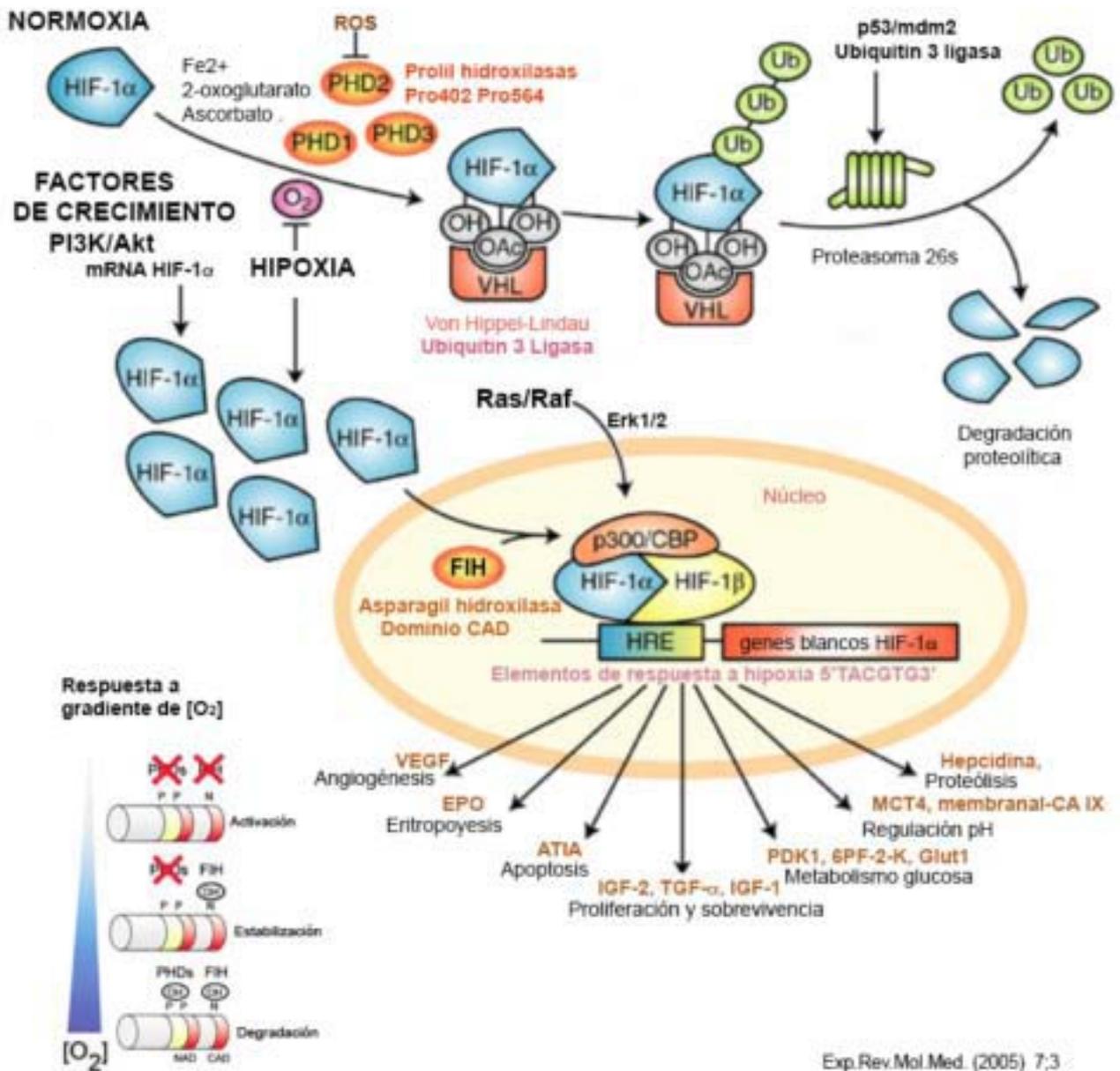
de expresión constitutiva. Mientras que ARNT1 y ARNT3 se expresan en todos los tejidos, ARNT2 es de expresión específica y está restringida a tejidos adultos del cerebro y los riñones [25-26]. Las proteínas HIF cuentan con un dominio bHLH de unión al DNA y un dominio PAS de dimerización, figura 3 [25].

Regulación de los factores HIF de manera dependiente de oxígeno

Bajo condiciones de normoxia (la concentración fisiológica de oxígeno es de 4-40 μM), las subunidades HIF α se expresan constitutivamente, al igual que HIF β , pero a diferencia de HIF β tienen una vida media muy corta pues son marcadas rápidamente vía ubiquitinación y degradadas por la actividad del proteasoma mediada por el factor pVHL (proteína von Hippel-Lindau, que es un supresor tumoral), componente del complejo ubiquitina ligasa E3, figura 4 [24]. El reconocimiento de HIF α por pVHL durante condiciones de normoxia, está mediado por la hidroxilación de dos residuos de prolina en HIF α catalizada por prolihdroxilasas parálogas: PHD 1-3. Estas enzimas son dioxigenasas non-heme-Fe(II) que utilizan oxígeno y 2-oxoglutarato como cosustratos, y hierro y ascorbato como cofactores, para romper moléculas de oxígeno. Un átomo de oxígeno es insertado en el péptido HIF α en el residuo de prolina, mientras que el otro reacciona con 2-oxoglutarato dando lugar a succinato y CO_2 como productos [27]. Los residuos de prolina que se hidroxilan forman parte del dominio ODD de las subunidades alfa (prolina 402 y 564 en HIF-1 α humano y prolina 405 y 531 en HIF-2 α humano) [28]. Bajo condiciones de hipoxia, la hidroxilación de prolina es suspendida y la proteína HIF α escapa a la degradación vía proteosoma, acumulandose y translocando al núcleo en donde se dimeriza con HIF-1 β . La subunidad alfa transloca al núcleo mediante dos señales de localización nuclear: 17-33 aa dentro del dominio bHLH y 718-721 aa dentro del dominio CAD (para HIF-1 α , NLS, figura 3). En el núcleo forma el dímero funcional con HIF β .



Cell Stem Cell. (2010) 7:159



Exp.Rev.Mol.Med. (2005) 7:3
 Cell Death Differ. (2008) 15:642.

Figura 4. Regulación de la actividad de los factores HIF. Dependiente de oxígeno.

En condiciones de normoxia la proteína HIF α es hidroxilada por la enzima PHD, lo cual la señala a ubiquitinación y degradación. Bajo condiciones de hipoxia las enzimas PHD se inactivan, HIF α se acumula y transloca al núcleo en donde se une con HIF β para formar el factor de transcripción activo. La enzima FIH, en presencia de oxígeno, hidroxila un residuo de asparagina dentro del dominio CAD lo cual impide la unión de coactivadores transcripcionales como p300/CBP. Cuando las concentraciones de oxígeno disminuyen aún más, FIH es inactivado lo cual permite la activación del dominio CAD y la completa activación del factor de transcripción HIF. **Independiente de oxígeno.** Acción de distintas vías de señalización sobre la actividad de los factores HIF: la degradación por la vía p53/mdm2 (mdm2, por sus siglas en inglés Mouse double minute 2 homolog), la estabilización por la vía PI3K/Akt y Ras/Raf trámite Erk1/2 permiten la completa activación del complejo transcripcional. Ejemplos de genes regulados por los factores transcripcionales HIF α : VEGF, Factor de crecimiento endotelio vascular; EPO, Eritropoietina; ATIA, Proteína anti-apoptosis inducida por TNF- α ; IGF-1/2, Factor de crecimiento tipo insulina 1/2, PDK1, Cinasa de la Piruvato deshidrogenasa tipo 1; 6PF-2-K, 6-Fosfofructo-2-cinasa; Glut 1, el Transportador de glucosa 1; MCT4, Transportador de monocarboxilato 4; membranal-CA IX, Anhidrasa carbónica anclada a membrana tipo IX.

El heterodímero HIF α / β se une a una secuencia pentanucleica central [5'-(A/G)CGT(G/C)-3'] presente en los elementos de respuesta a hipoxia (región HRE) de las secuencias promotoras o los enhancers de los genes blanco [20] e induce su expresión mediante el reclutamiento de cofactores (p300/CBP), figura 4 [29]. Las interacciones entre HIF y los cofactores transcripcionales también son reguladas de manera dependiente de oxígeno por una asparagil-hidroxilasa, FIH-1 (por sus siglas en inglés, Factor Inhibiting HIF-1). FIH usa oxígeno para hidroxilar residuos de asparagina (Asparagina 803 en HIF-1 α y Asparagina 851 en HIF-2 α humano) dentro del dominio transcripcional (CAD) C-terminal. En contraste con la hidroxilación de prolina que dirige la degradación de la proteína, la hidroxilación de asparagina evita el reclutamiento de proteínas coactivadoras de la transcripción como p300 [30]. Las dos enzimas sensoras de oxígeno, PHD y FIH, cuentan con Km diferentes; FIH tiene una afinidad más alta por el oxígeno (Km = 90 μ M) mientras que las PHD tienen una afinidad más baja (Km = 250 μ M). Debido a esto, las PHD se inactivan como primera respuesta a hipoxia permitiendo la estabilización de la proteína HIF α , mientras que la enzima FIH sigue funcionando y limita la actividad transcripcional de HIF. A medida que las condiciones de hipoxia aumenten, y la concentración de oxígeno disminuye, FIH también se inactivará, permitiendo la completa activación de HIF como factor transcripcional, figura 4 [31]. Esta regulación en dominios de transactivación

tienen diferentes consecuencias, se ha visto que el dominio TAD es el que define la especificidad de los genes blanco de HIF-1 α y HIF-2 α [31-33].

Regulación de los factores HIF de manera independiente de oxígeno

La estabilidad y degradación de HIF α también se regula de manera independiente de oxígeno. Las proteínas HIF α pueden ser estabilizadas de manera dependiente de especies reactivas de oxígeno (ROS), figura 4. La inhibición de la producción de ROS por parte de la mitocondria bloquea la estabilización de las proteínas HIF α . Aunque todavía no se sabe de manera concreta cómo se da esta inhibición, se ha visto que elevados niveles de H₂O₂ inhiben a las PHD ya que disminuyen la disponibilidad de Fe²⁺, que es necesario para la hidroxilación [34]. Estudios genéticos muestran que la perturbación del complejo III (citocromo C), de la cadena transportadora de electrones, bloquea la estabilización de HIF α , pero la perturbación del complejo IV no lo hace. Esto sugieren que la respiración no es requerida para la estabilización de HIF α pero el paso de electrones al citocromo C sí lo es, enfatizando la importancia de los ROS [34]. Muchos factores de crecimiento tienen efectos positivos en el sistema HIF. La síntesis de la proteína HIF α puede ser inducida por diferentes hormonas, factores de crecimiento y citocinas, como la insulina, factor de crecimiento parecido a insulina (IGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Existe evidencia de que la vía PI3K/Akt regula la actividad de HIF de una manera dependiente de mTOR, y que mTOR regula la traducción del mRNA de HIF α [35]. Además, p42/44 cinasas activadas por mitógenos (MAPK) están implicadas en la fosforilación de HIF α dentro de los dominios de transactivación, lo que permite que los coactivadores CBP/p300 se unan con mayor afinidad a HIF, figura 4 [36-37]. Además de la ubiquitinación mediada por pVHL existen mecanismos de ubiquitinación independientes de pVHL de la subunidad α y su consecuente degradación. El supresor tumoral p53 es capaz de unirse a HIF α , esta unión recluta a mdm2, una ubiquitin ligasa, provocando su degradación proteosomal. Congruente con esto, se ha reportado que la pérdida de p53 en células tumorales aumenta los niveles de HIF α [38].

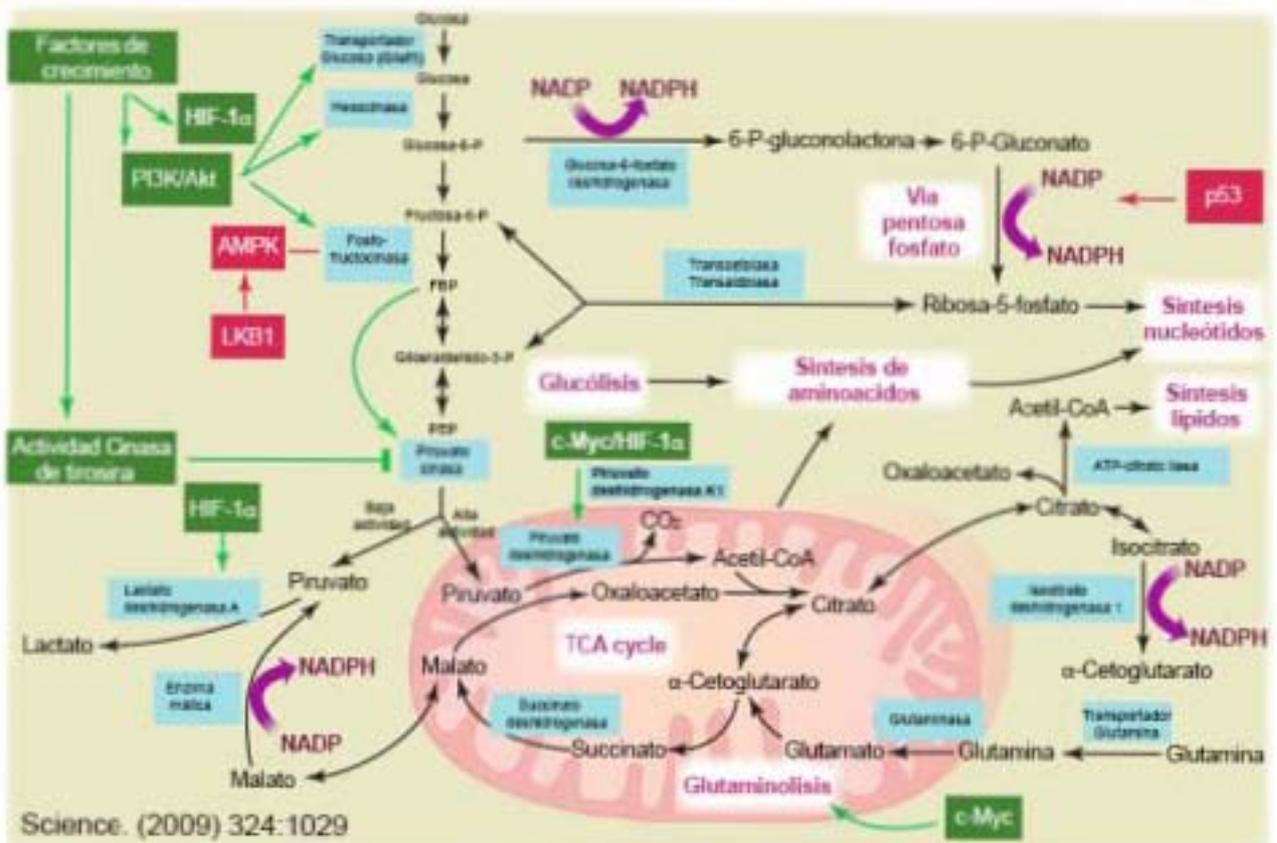
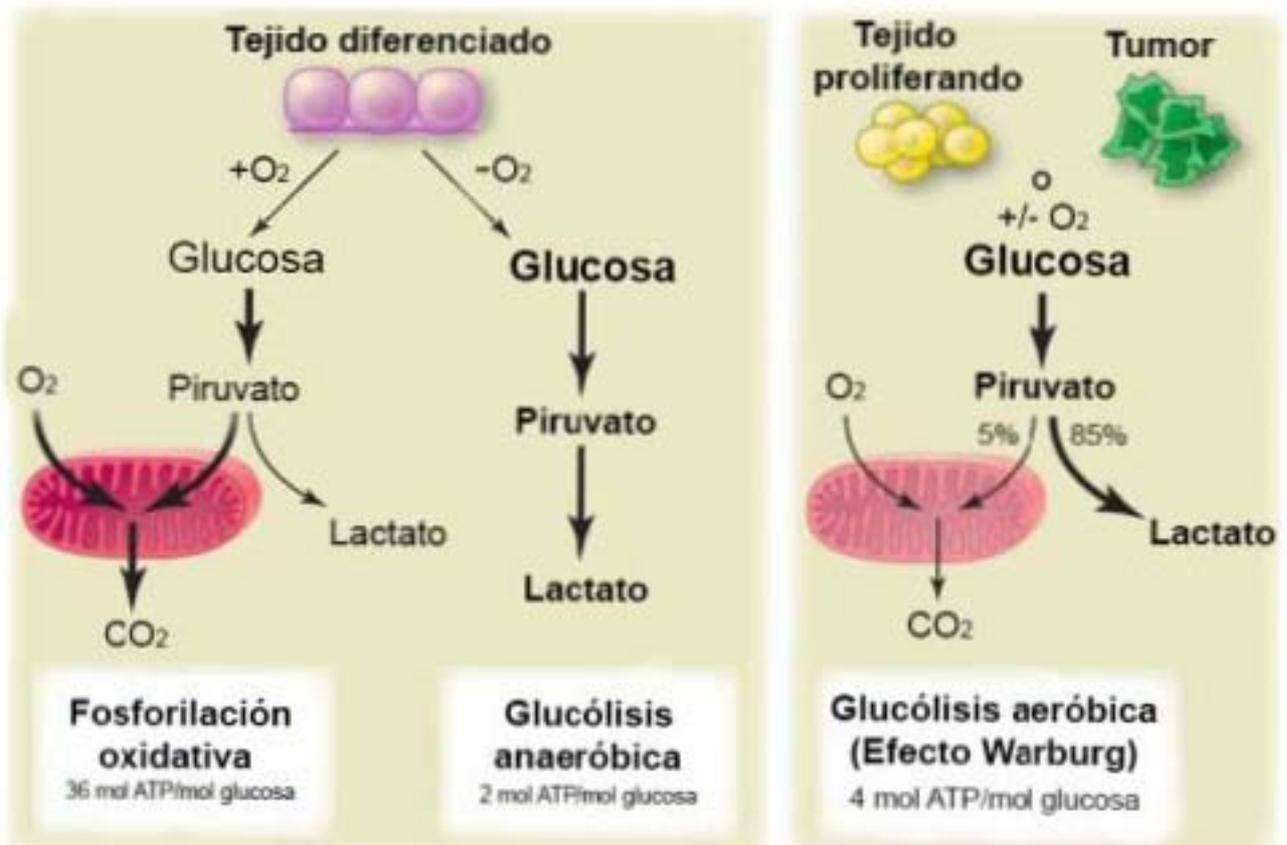


Figura 5. Glucólisis anaérobica, efecto Warburg. Interconexiones metabólicas entre la glucólisis, fosforilación oxidativa, pentosa fosfato y el metabolismo de la glutamina en células en proliferación activa. Estas vías metabólicas están sujetas a regulación por la activación de los receptores para factores de crecimiento. La activación de PI3K y AKT estimula la captación de glucosa. La señalización a través de cinasas de tirosina regula negativamente la glucólisis poniendo en disposición metabolitos intermedios para la producción de NADH o la síntesis de macromoléculas. c-Myc dirige el metabolismo de la glutamina que también sustenta la producción de NADPH. La actividad de LKB1/AMPK y p53 disminuyen el flujo metabólico hacia la glucólisis en respuesta a estrés energético u oxidativo como respuesta adaptativa para bloquear el metabolismo proliferativo.

Además se ha observado que, en el citoplasma, HIF α se asocia a la proteína de choque-térmico 90 (heat shock protein 90, Hsp90), lo que promueve su estabilidad. Cuando Hsp90 es desplazada por sus inhibidores, el receptor de la proteína cinasa C activada (RACK1) se une a HIF α promoviendo su ubiquitinación y degradación [39].

HIF y su papel en el cáncer

Varios eventos característicos del desarrollo y la sobrevivencia tumoral como el metabolismo glucolítico, proliferación, angiogénesis y metástasis son regulados por los factores HIF [40]. El metabolismo glucolítico aeróbico, o efecto Warburg, figura 5, es una importante adaptación a hipoxia donde se observa una reducida capacidad de oxidación mitocondrial, glucólisis aumentada y producción excesiva de ácido láctico, aún bajo condiciones aeróbicas. Esto favorece la supervivencia en microambientes hipóxicos e impacta la progresión tumoral. En presencia de oxígeno las células diferenciadas metabolizan glucosa en dióxido de carbono por oxidación glucolítica, a partir de piruvato en la mitocondria, vía el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Esta vía produce NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida) que alimenta la fosforilación oxidativa para maximizar la producción de ATP con la mínima producción de lactato y usa como aceptor final de electrones el oxígeno. Solo bajo condiciones anaeróbicas las células redireccionan la generación de piruvato fuera de la mitocondria y producen grandes cantidades de lactato, permitiendo a la glucólisis continuar ciclando NADH a NAD⁺. En contraste, las células en activa proliferación, normales o malignas, figura 5, producen grandes cantidades de lactato sin importar la disponibilidad de oxígeno y la mitocondria, que es funcional, mantiene niveles bajos de fosforilación oxidativa. Este metabolismo fue descrito en el cáncer por Otto Warburg en 1924.

El metabolismo de glucosa a lactato genera solo 2 ATP, por molécula de glucosa, mientras que la fosforilación oxidativa genera 36 ATP después de la completa oxidación de la glucosa. ¿Por qué células en continua proliferación, procariontes y eucariontes, han seleccionado un metabolismo menos eficiente, al menos en lo que concierne a la producción de ATP? Hay una posible explicación, el convertir toda la glucosa a CO₂, por la vía de la fosforilación oxidativa maximizando la producción de ATP, va contra las necesidades de una célula proliferando. Parte de la glucosa debe convertirse en precursores de macromoléculas como el acetil-CoA para la vía de ácidos grasos, o intermediarios glucolíticos para la construcción de aminoácidos no esenciales, ribosa y nucleótidos, y es precisamente el metabolismo de la glucosa y la glutamina quienes soportan la producción de esos precursores, figura 5 [41].

El efecto Warburg representa una de las características más universales de los tumores sólidos y es usada con carácter diagnóstico [23]. La adaptación a hipoxia es un paso importante en la progresión tumoral, la metástasis también es promovida por la hipoxia [42]. La metástasis es un proceso coordinado donde quimiocinas dirigen la migración celular, moléculas de adhesión promueven el anclaje en diferentes órganos y proteasas, y otras enzimas secretadas, degradan y remodelan la matriz extracelular. Estudios en cáncer de mama, riñón y colon muestran que el receptor de quimiocinas CXCR4, mediador de metástasis, es inducido por HIF [43]. Otros blancos regulados por los factores HIF son las metaloproteínas de matriz (MMP) 2 y 9 que en tejidos epiteliales de pulmón favorecen la metástasis [42]; y la lisil oxidasa, enzima que modula las propiedades mecánicas de la matriz extracelular, su inhibición bloquea *in vitro* la migración e *in vivo* la metástasis desde el xenótransplante subcutáneo o injertado en la vena de la cola del ratón [44-45].

La sobreexpresión de HIF α ocurre en el cáncer como una respuesta a estímulos tanto fisiológicos (hipoxia, factores de crecimiento) como patológicos (mutaciones). La actividad de HIF puede ser inducida en células tumorales mediante la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt o la pérdida de pVHL [46]. Las alteraciones en las rutas metabólicas que afectan la actividad de las PHD también puede promover la estabilización de HIF α en normoxia, la inactivación de la Succinato deshidrogenasa, que ocurre en algunos cánceres

renales, de tiroides y de colon, conlleva a la acumulación de succinato y a la inhibición de las PHD [47]. La traducción de HIF α puede desregularse por fallas en la regulación de mTOR provocando un aumento en la traducción de esta proteína sin sufrir cambios en su degradación, dando como resultado un aumento neto en la cantidad de proteínas HIF α presentes en la célula. Esto ocurre de manera frecuente en todos los tumores que presentan una hiperactivación de los receptores tirosina cinasa, al igual que en tumores que presentan otras mutaciones que afecten la vía mTOR [48]. Además de su actividad como factor transcripcional, en sus genes blanco directos, HIF puede regular a los factores transcripcionales Notch y c-Myc. Se ha reportado que HIF-1 α necesita a Notch para mantener el estado indiferenciado interactuando directamente con el dominio intracelular de Notch1, lo que aumenta su vida media y actividad transcripcional [49]. Por otro lado, mientras HIF-1 α inhibe directamente a c-Myc causando la inactivación de p21, p27 y genes involucrados en reparación "mismatch" (MMR) del DNA (posicionándola como regulador de la inestabilidad genética inducida por hipoxia), HIF-2 α promueve la actividad transcripcional de c-Myc [50-51]. El sistema MMR corrige errores en la correspondencia base-base que podrían ocasionar mutaciones puntuales o inserciones/deleciones que se traducen en mutaciones o el desfase del marco de lectura. La vía MMR, como otras vías de reparación, involucra muchas proteínas que actúan secuencialmente para reparar los daños al DNA. Primero, los daños son reconocidos por MutS α , proteína dimerica formada por MSH2/MSH6, o por MutS β , dímero formado por MSH2/MSH3. La eliminación de los errores inicia con la unión de MutL α , dímero formado por MLH1/PMS2, o MutL β , dímero formado por MLH1/ MLH3, y finalmente es reclutada la exonucleasa EXO1 que remueve secuencialmente los nucleótidos cercanos a la falta de coincidencia en la cadena hija. Para reparar los daños, la cadena es resintetizada por la DNA polimerasa δ junto con PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) y RPA (Replication protein A) y ligada por la DNA ligasa. Los genes de reparación del DNA que son regulados negativamente por la activación de HIF-1 α y su interacción con c-Myc son MSH2, MSH6 y NBS1. MSH2 está involucrado en distintas formas de reparación del DNA y recombinación homóloga. MSH6 es un homólogo MutS y forma heterodímeros con MSH2. NBS1 participa en la reparación de rupturas de doble cadena

formando un complejo con hMre11 y RAD50 del sistema de reparación de rupturas de doble cadena de DNA [52].

HIF-1 α vs. HIF-2 α

Los dímeros HIF-1 α / HIF-1 β y HIF-2 α / HIF-1 β son los principales factores que regulan la respuesta a hipoxia. HIF-1 α y HIF-2 α tienen muchas similitudes en la estructura de sus dominios. HIF-1 α y HIF-2 α son proteínas homólogas y comparten un 85 y 70% de identidad en el dominio de unión a DNA y el dominio de dimerización, respectivamente. Los aminoácidos que rodean los dos residuos de prolina sensibles a oxígeno (30 aa a cada uno) son altamente conservados entre las dos subunidades alfa (70% de similitud). El dominio CAD comparte un 67% de similitud mientras el dominio TAD un 40%. Estas similitudes proporcionan la base molecular para explicar propiedades comunes entre HIF-1 α y HIF-2 α . Los dos usan a HIF-1 β (ARNT) como compañero de dimerización, la estabilidad de las dos proteínas se regula de manera dependiente de oxígeno, y la actividad transcripcional del dominio CAD en los dos casos es regulada por FIH [33]. En estudios recientes se ha demostrado que HIF-1 α y HIF-2 α regulan la expresión de genes tanto comunes como específicos a cada subunidad. Los genes que codifican para las enzimas glucolíticas como la Piruvato deshidrogenasa cinasa, Fosfoglicerato cinasa, Lactato deshidrogenasa A, entre otros, son regulados de manera específica por HIF-1 α . Mientras que otros genes son específicos de HIF-2 α , como Oct4, Ciclina D1, el Factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α y TGF- β), entre otros. Pero la mayoría de los genes blanco de HIF son regulados tanto por HIF-1 α como por HIF-2 α , incluyendo al gen que codifica para el Factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) y el Transportador de glucosa 1 (Glut-1) [32, 53].

Se ha reportado que el dominio TAD es el que confiere la especificidad de genes blanco mientras que el dominio CAD promueve la expresión de genes comunes para HIF-1 α y HIF-2 α . [32]. La expresión de las dos subunidades es dependiente de tejido al igual que la regulación de la transcripción de genes blanco. Mientras que HIF-1 α se expresa de manera más frecuente en todos los tejidos, la expresión de HIF-2 α es tejido específica. La expresión de HIF-2 α se limita al endotelio, riñón, corazón, pulmón, epitelio gastrointestinal y a algunas células del

sistema nervioso central [54]. En algunos tejidos, HIF-1 α puede regular de manera preferencial la expresión de unos genes, mientras que en otros tejidos esos genes son regulados de manera preferencial por HIF-2 α . Por ejemplo, la expresión de Glut-1 en las células Hep3B (células de hepatoma humano) y en las células troncales embrionarias de ratón, está regulado por HIF-2 α , mientras que en las células 786-O (células de carcinoma de hígado) y en las células WT8 (células de carcinoma renal) es regulado por HIF-1 α . [32, 55-56].

Los estudios de delección génica de HIF-1 α en ratón, muestran un mal desarrollo cardiovascular y letalidad en E10.5 [57-58]. La pérdida de HIF-2 α conlleva a una serie de fenotipos, dependientes del contexto genético del ratón, incluyendo la letalidad embrionaria debida a defectos vasculares y bradicardia, letalidad perinatal debida a la incorrecta maduración de pulmones, y letalidad embrionaria y postnatal causada por un falla múltiple de órganos y disfunción mitocondrial [59-60]. Las diferencias de los genes blanco y de los fenotipos de ratones con delecciones génicas sugieren que HIF-2 α está involucrado en promover fenotipos tumorales distintos dependiendo del tejido que lo expresa. Esto ha sido observado en tumores del sistema nervioso central, colorectales, de pulmón y de cabeza y cuello, en donde la expresión de HIF-2 α se asocia a un peor pronóstico en comparación al de HIF-1 α . También se ha visto que HIF-2 α de manera preferente promueve la tumorigénesis debido a un aumento en la proliferación; probablemente por un incremento en la expresión de TCF y Ciclina D1 [60].

Comunicación entre la vía Wnt y la actividad de los factores HIF

La ruta de señalización Wnt es la fuerza principal en el control de la homeostasis del epitelio intestinal, cuando está alterada se produce cáncer. Los programas de expresión génica generados por los ligandos Wnt están involucrados en proliferación, al promover la transcripción de genes como c-Myc. c-Myc es un protooncogene identificado como blanco de la vía Wnt en estudios *in vitro* en líneas celulares de cáncer de colon y en el epitelio de las criptas intestinales, tras la delección de APC *in vivo*. En la homeostasis intestinal, Myc es esencial en la formación de las criptas intestinales y se asocia con el mantenimiento de las células troncales madre. Myc es un factor transcripcional que regula más del 20% del genoma, actúa como un regulador global de transcripción para grupos de

genes involucrados en apoptosis, regulación del ciclo celular, metabolismo, biogénesis ribosomal, síntesis de proteínas, función mitocondrial, adhesión celular, reparación de DNA y angiogénesis. Myc es un factor transcripcional con una estructura hélice-giro-hélice zipper de leucina, que forma un heterodímero con otra proteína, proteína X de asociación a Myc (MAX), que a su vez está bajo una regulación rigurosa por una serie de interacciones proteína-proteína con MAD (MXD1; proteína de dimerización con MAX) y MAD2 (MXI1; interactor MAX 1). Después de dimerizar, Myc-MAX, se unen a cajas E para activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco [61]. Myc está implicado en el control de la proliferación celular, muerte celular programada, diferenciación y activa todos los genes involucrados en la glucólisis. Responde a señales de crecimiento en fase G1 activando la transcripción de genes que inducen la progresión del ciclo celular como: Cdc25A, Ciclinas D1, D2, E, A, cinasas dependientes de ciclinas tales como Cdk1, Cdk2, Cdk4 y además E2F. La expresión de c-Myc está ausente en células quiescentes pero se induce rápidamente al adicionar factores de crecimiento. Muchos estudios han mostrado que c-Myc regula la expresión de CycE y A, al igual que en el mantenimiento de la actividad de cinasa de CycE/Cdk2 por la inducción de una proteína no identificada que secuestra a p27, lo que permite que el complejo CycE/Cdk2 permanezca activo y por ende la progresión del ciclo celular (G1 a S) [62].

HIF-1 α y HIF-2 α interactúan de varias maneras con el factor transcripcional c-Myc, figura 6. Por un lado, en estado fisiológico, en el que existe una expresión baja de c-Myc, HIF-1 α antagoniza las funciones de c-Myc y promueve arresto celular. HIF-1 α compite con c-Myc por la unión a MAX, impidiendo de esta manera la formación del complejo activo MAX/Myc (estado fisiológico, figura 6). En estado oncológico, en donde c-Myc se sobrepresa (como ocurre en el 30% de los cánceres humanos como el de colon, próstata y mama), HIF-1 α no logra inhibir su función y en consecuencia estos dos factores transcripcionales cooperan dándole muchas ventajas adaptativas a las células cancerígenas (como el establecimiento del efecto Warburg en estado oncológico, figura 6). En contraste, se ha reportado que HIF-2 α siempre favorece las acciones mediadas por c-Myc, tanto en condiciones normales como oncogénicas, y cuando c-Myc se expresa en niveles altos, se unen a una nueva serie de genes blanco, sugiriendo que parte del

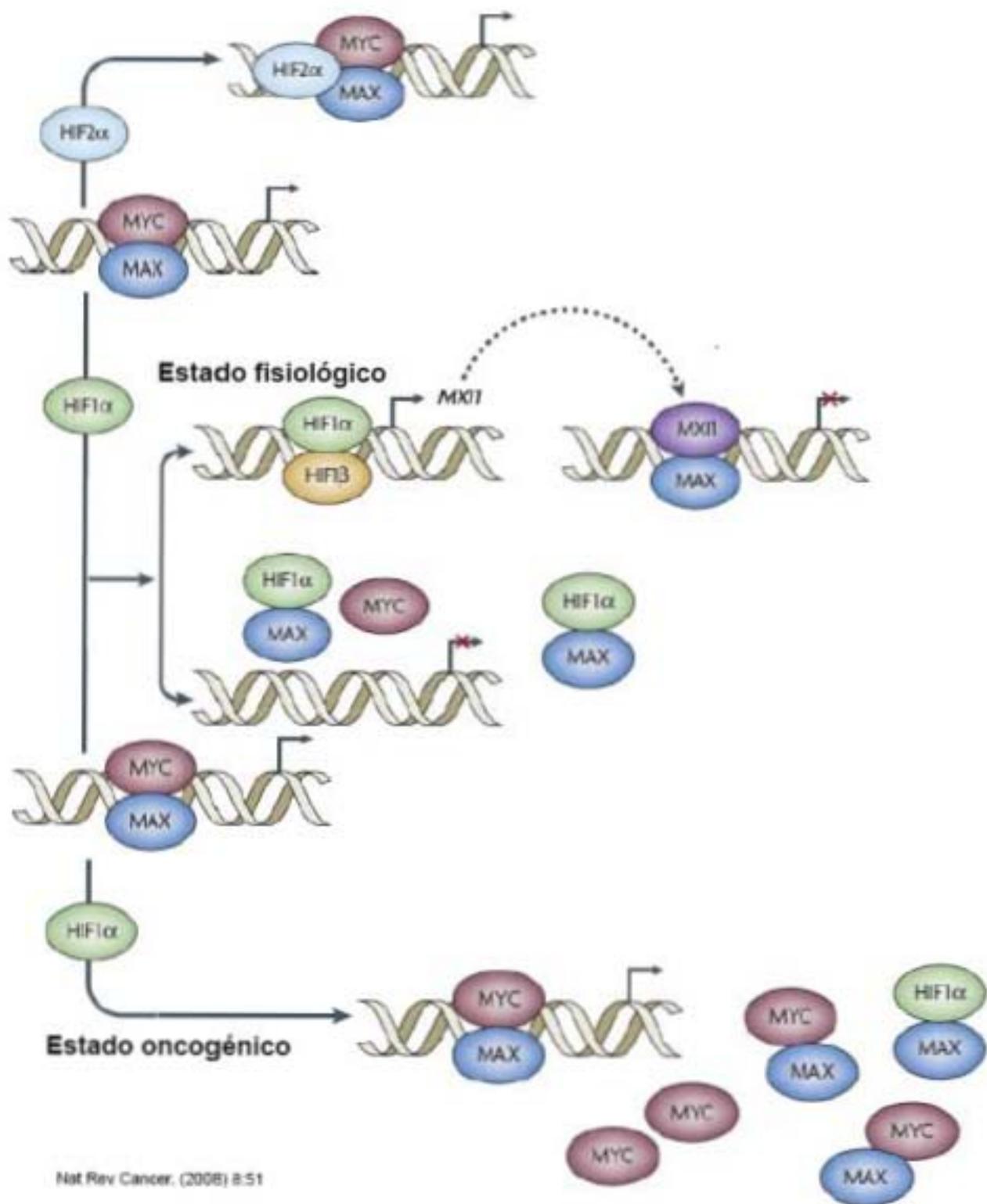
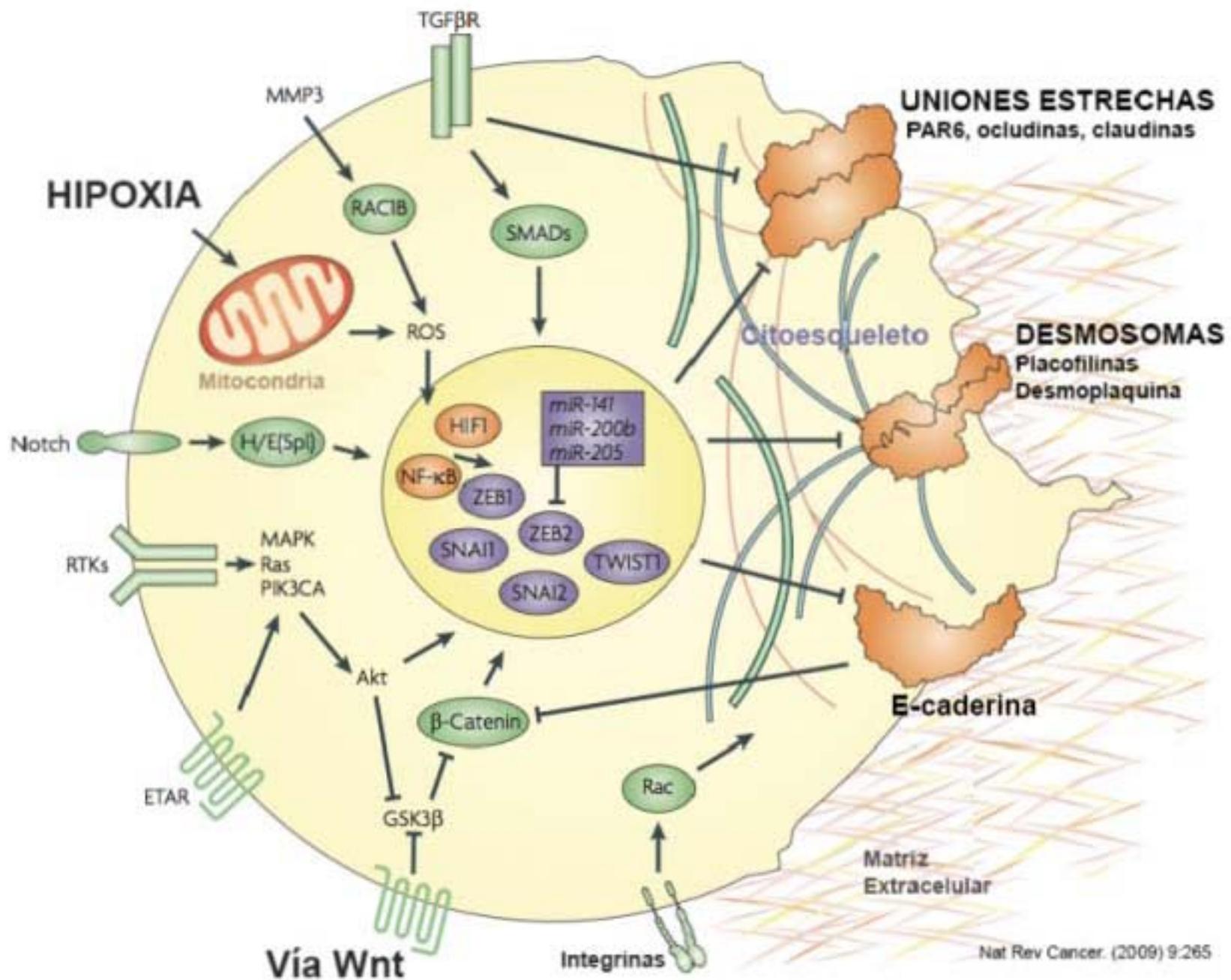


Figura 6. Regulación de la actividad de c-Myc por la interacción con los factores HIF α . Interacciones proteína-proteína entre c-Myc, HIF-1 α y HIF2 α ; sistema transcripcional. Estado fisiológico: Mientras que HIF-2 α estabiliza y promueve la formación del complejo Myc-MAX, promoviendo de esta manera la activación de genes regulados por c-Myc, HIF-1 α antagoniza las acciones mediadas por Myc al unirse a MAX impidiendo la formación del complejo activo Myc-MAX. Además, HIF-1 α induce la expresión de MAX11, un antagonista de c-Myc. Estado oncogénico: cuando c-Myc está sobre expresado, el antagonismo ejercido por HIF-1 α queda anulado por la ley de acción de masas, ya que los niveles altos de la proteína Myc mantienen el heterodimero Myc-MAX activo en mayor proporción [61]. En estas condiciones, HIF-2 α continúa favoreciendo las acciones mediadas por el complejo Myc-MAX.

comportamiento de Myc depende de sus niveles de expresión, figura 6 [61]. HIF-1 α es requerido durante el arresto del ciclo celular a través de la inducción de p21, por una interacción directa entre HIF-1 α y Myc. La interacción HIF-Myc libera a MIZ1, un miembro de la familia POZI, de la inhibición por c-Myc para estimular la expresión de p21 [50, 62]. Además de los efectos en el ciclo celular, se ha reportado que HIF-1 libera al factor transcripcional Sp1, que es requerido para la activación del promotor por el complejo Myc/MAX, y esto inhibe a los genes blanco estimulados por c-Myc: MSH2, MSH6 y del síndrome de ruptura Nijmegen 1 (NBN), que están involucrados en la respuesta al daño en el DNA. La inhibición de estos genes a través de la unión de HIF-1 α a Sp1 participa en la estimulación de la inestabilidad genómica inducida por hipoxia [50, 52] La sustitución de los residuos V317, A321 y T327, involucrados en suprimir la actividad dependiente de la unión a Sp1, del dominio PAS-B de HIF-1 α por los residuos correspondientes de HIF-2 α , provee una explicación para la inhabilidad de HIF-2 α en reprimir los genes de reparación de DNA. Las mutantes VAT de HIF-1 α no inhiben la expresión de Msh2 y Nbs1, y las mutaciones recíprocas en HIF-2 α resultan en una ganancia de función para la represión de esos genes [52]. A diferencia de HIF-1 α , HIF-2 α colabora con Myc uniéndose y estabilizando el heterodímero Myc-MAX. Este modelo requiere validación por estudios biofísicos más precisos del complejo Myc-MAX/HIF-2 α . Parece razonable que HIF-2 α tenga efectos estimulatorios sobre Myc, ya que las células endoteliales donde HIF-2 α se describió por primera vez, pueden proliferar bajo hipoxia. Es más difícil entender el significado fisiológico de la colaboración de HIF-2 α y Myc en tejidos que también expresan HIF-1 α . Debido a los efectos opuestos de HIF-1 α e HIF-2 α



sobre Myc, cabe preguntarse cómo Myc es modulado en células que expresan tanto HIF-1 α como HIF-2 α [61].

Se ha reportado que existe comunicación cruzada entre la vía de señalización canónica Wnt y las vías de señalización que regulan la actividad HIF durante la progresión tumoral y la metástasis. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en establecer esta comunicación son desconocidos. Distintos reportes indican que la actividad de los HIF juegan un papel importante en la regulación de la quiescencia de las células troncales [63] y la actividad de Wnt mediada por HIF-1 α promueve el fenotipo de célula troncal. Al respecto, Mazumdar *et al.* demostraron que HIF-1 α modula la señalización mediada por Wnt/ β -catenina bajo condiciones de hipoxia en células troncales embrionarias incrementando la activación de β -catenina y la expresión de los efectores LEF-1 y TCF-1 [64]. Además, evidencia experimental apoya la hipótesis de que tanto condiciones hipóxicas como la activación de la vía Wnt canónica están involucradas en activar el programa de transición epitelio-mesénquima (EMT) en muchos tipos celulares cancerosos, figura 7 [65-66].

Programa de transición epitelio-mesénquima.

Las células mesenquimales son una gran invención de los metazoarios que permiten la formación del embrión a través de la gastrulación. Estas células son capaces de migrar y reubicarse en sitios donde interaccionan con el epitelio o pueden diferenciarse para generar nuevas estructuras. La aparición de las células mesenquimales durante la evolución ocurrió hace más de 600 millones de años como un paso en el establecimiento de las tres capas germinales. Las esponjas no tienen mesodermo, ni ninguna capa estructurada, y por lo tanto no pueden formar tejidos ni órganos. Los Cnidarie evolucionaron a partir de protozoarios coloniales primitivos, pero, representan especies diploblásticas con ectodermo y endodermo, lo que les permite desarrollar estructuras histológicas más complejas, aún cuando carecen de mesodermo. La EMT representó una ventaja durante la morfogénesis durante la aparición de los Vertebrados, un subphylum Chordata. La morfogénesis de las somitas y la ontogenia de la cresta neural son dos procesos embrionarios adquiridos esenciales en la evolución de todo el Phylum [67].

Figura 7. Transición Epitelio-Mesénquima. Una visión simplificada de las vías de señalización que regulan el establecimiento del programa EMT. Receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTKs), Factor de crecimiento transformante- β (TGF β), Notch, Receptor A de endotelio (ETAR), Integrinas, Vía de señalización Wnt, Hipoxia y señales desde la matriz extracelular pueden inducir EMT a través de múltiples vías. EMT se asocia a cambios dramáticos en la reorganización del citoesqueleto y la composición de la matriz extracelular para poder responder a las vías que lo inducen, perder conexión con el sustrato y poder cambiar de morfología. Las señales que inducen EMT pueden conducir al desensamble de las uniones estrechas y los desmosomas a través de fosforilación (fosforilación del regulador de la polaridad celular alfa de la familia Par-6, PAR6A, mediada por la señalización inducida por TGF- β) o reprimiendo la expresión de proteínas (por ejemplo ZEB1, por sus siglas en inglés Zinc finger E-box-binding homeobox 1, reprime a la placofilina). EMT puede inducir cambios en la matriz extracelular remodelándola, por la actividad de metaloproteinasas o la lisil oxidasa, e inducir la expresión de fibronectina o colágenas. La hipoxia, la activación de RAC1B (por sus siglas en inglés Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, miembro de la superfamilia Ras) y de vías como la de Akt, pueden incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria con efectos pleiotrópicos como la activación de factores transcripcionales como HIF1 α y NF- κ B, y la señalización vía GSK-3 β . Más allá de la interacción entre las diferentes vías existe un extenso intercambio de información entre los factores transcripcionales activados: HIF α , NF- κ B, ZEB1/2, Snail1/2, Twist 1, TCF-4/ β -catenina, SMAD como algunos ejemplos.

Los detalles en las estrategias durante la EMT en cada especie difieren en varios sitios en el embrión. Sin embargo, las moléculas implicadas fueron conservadas evolutivamente e incluyen Wnt, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), Snail 1, el Factor nuclear κ B (NF κ B) y E-caderina. Reminiscencias de las vías moleculares asociadas a ello, son Snail 1 y algunas de sus funciones.

Una gran variedad de vías pueden inducir Snail 1 durante el desarrollo, muchas fueron conservadas durante la evolución y solo pocas están restringidas a los vertebrados. Snail 1 se expresa en el endodermo de los Cnidarie, formado por invaginación del ectodermo. Wnts y Snail 1 fueron utilizados para inducir la plasticidad epitelial antes del establecimiento del programa EMT durante la evolución. De esta vía, queda como reminiscencia, la expresión de Snail 1 durante la invaginación del mesodermo en *Drosophila melanogaster*. Es claro que Snail 1 no es el inductor primario del mesodermo en la cresta neural, pero contribuye a la plasticidad epitelial y el programa EMT, modulando las interacciones de adhesión permitiendo el movimiento celular. Por otra parte, la función anti-apoptótica de Snail 1 es importante en el embrión pues las células epiteliales necesitan protección de la muerte celular ocasionada por los cambios morfológicos que ocurren durante la EMT [revisado en 67].

El programa EMT es generalmente inducido en células epiteliales por señales heterotípicas generadas por células mesenquimales que constituyen el estroma en tejidos normales o cancerosos. La señalización incluye componentes de la matriz extracelular, como el colágeno y el ácido hialurónico, así como factores de crecimiento solubles como miembros de las familias del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento de hepatocitos (SF/HGF). Los miembros de la familia del TGF- β son los inductores de EMT mejor caracterizados durante el curso del desarrollo embrionario, el mantenimiento de la pluripotencia en células embrionarias troncales humanas durante toda las fases de la ontogenia, el cierre de herida (wound-healing), enfermedades fibróticas y el cáncer. TGF- β puede inducir EMT a través de múltiples mecanismos de señalización incluyendo la fosforilación mediada por los receptores de los factores transcripcionales SMAD2, SMAD3 y la proteína de polaridad celular pAr6A, que conduce a la pérdida de la polaridad apical-basal y a la disolución de las uniones adyacentes en el epitelio. Así como TGF- β , la señalización mediada por receptores para factores de crecimiento activan efectores intracelulares como miembros de la familia de las GTPasas pequeñas, Ras, Rho y Rac, y miembros de la familia de las cinasas de tirosina Src, que orquestan el desensamble de los complejos de unión celular y cambios en la organización del citoesqueleto que ocurren durante el EMT o la activación de factores transcripcionales, como Snail 1 e Slug, que redireccionan el patrón de expresión génica estableciendo el programa EMT. Estas señales también puede influenciar la actividad de otras vías inductoras de EMT, como lo son Notch y Wnt, y actuar conjuntamente para establecer el programa EMT. La vía Wnt puede dirigir a EMT a través de la inhibición de GSK-3 β y la consecuente acumulación de β -catenina, que actuará como subunidad en la transcripción de genes que especifican EMT, regulando la actividad de los factores LEF/TCF-4 (lymphoid-enhancer-binding factor/T-cell factor-4). Sin embargo, β -catenina por si misma no es suficiente para inducir EMT. En la gran mayoría de casos de cáncer de colon se observa la desactivación de APC o la activación de β -catenina sin el establecimiento del fenotipo mesenquimal. Otras señales son necesarias. Notch, como ya se mencionó, también juega un papel importante en la regulación EMT tanto en la embriogénesis como la tumorigénesis. La compleja vía Notch involucra múltiples ligandos, receptores y mediadores cascada abajo. Su activación es

tejido específica y puede resultar tanto oncogénica como suprimir la actividad tumoral. Notch puede inducir EMT por la activación de NF- κ B o modulando la actividad de la señalización generada por TGF- β . La vía Hedgehog también participa en la regulación, establecimiento del programa EMT y la metástasis en el cáncer. Esto parece indicar que las vías de señalización involucradas en la regulación de las células troncales y su nicho regulan la activación del programa EMT interconectándose para establecer y mantener las características asociadas al fenotipo troncal [revisado en 68].

El nicho celular también juega un papel fundamental en el establecimiento del programa EMT. La hipoxia y la activación de la señalización dependiente de factores de crecimiento puede conducir a la activación de los factores transcripcionales HIF α , del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), Snail1 y Twist1, así como la activación de las vías Notch o NF- κ B, y la inducción de la hipometilación del DNA. Bajos niveles de oxígeno (3%) inducen EMT en distintos tipos de cáncer, inhibiendo la actividad de GSK-3 β y activando la transcripción mediada por β -catenina. Se ha reportado que bajo condiciones hipóxicas, las células se vuelven más invasivas y la vía Wnt/ β -catenina está activa, al igual que el factor Snail 1. En otros estudios se ha observado que el establecimiento del programa EMT inducido por hipoxia requiere de la actividad de la vía Notch. Se ha observado que la activación de Snail 1 causa la represión de la expresión de E-caderina y eso provoca la activación de β -catenina y estabiliza la expresión de factores transcripcionales que controlan el programa EMT. La presencia de especies reactivas de oxígeno puede inducir la expresión de la metaloproteinasa-11 de matriz extracelular y provocar EMT, fenómeno observado en células epiteliales de mama. Otros cambios pueden contribuir al establecimiento del programa EMT: la expresión de E-caderina se pierde en muchos tumores a través de mecanismos genéticos y epigenéticos. Esto libera una buena proporción de β -catenina, que normalmente se encuentra asociada al tallo citoplásmico de E-caderina y activa la vía Wnt canónica y el programa EMT. Estos mecanismos pueden dirigir el establecimiento del estado mesenquimal en muchos tipos de cáncer, haciendo su expresión independiente de inductores de EMT e induciendo señales heterotípicas que emanan del microambiente tumoral. Numerosas observaciones soportan la idea de que el establecimiento del programa EMT tiene

un papel central en la progresión tumoral (caja 5) . Durante la progresión hacia la adquisición de la capacidad metastásica las células del carcinoma establecen las características y los patrones de expresión de células mesenquimales lo que se traduce en cambios en la capacidad de adhesión, en la activación de proteólisis y migración [revisado en 67-68].

Caja 5. El programa EMT en la progresión tumoral [67].

- Expresión de proteínas asociadas al fenotipo mesenquimal: vimentina, proteína-1 específica de fibroblastos (FSP1/S100A4), Snail 1 y Snail 2, β -catenina nuclear y la metaloproteínasa-11 de matriz extracelular.
- Pérdida de marcadores epiteliales: E-caderina. La manipulación de la expresión de E-caderina causa cambios tanto morfológicos como en el comportamiento invasivo.
- La invasión por los adenocarcinomas está acompañada de la liberación de células a través del establecimiento del programa EMT.
- Los Sarcomas contienen poblaciones celulares con fenotipos asociados al sarcoma y otros al carcinoma. Ambas poblaciones se originan a partir de un precursor epitelial común.
- FSP1/S100A4 es un marcador de linaje mesenquimal. La depleción de las células que expresan a FSP1/S100A4 impide la metástasis.
- La expresión condicional de ERBB2 (el Receptor con actividad de tirosina cinasa erbB-2, también conocido como CD340 o Receptor para el factor de crecimiento humano 2) induce la formación de tumores, fenotipo que se revierte tras el silenciamiento de ERBB2. Estos tumores se vuelven a presentar y hacen metástasis tras la espontánea inducción de la expresión de Snail 1 y presentan un fenotipo mesenquimal.
- Claudina-1, componente de las uniones estrechas, es sobreexpresada en tumores del colon. Claudina-1 induce cambios en la expresión del patrón genético característico de EMT y promueve metástasis. La inhibición de su expresión inhibe la metástasis de células metastásicas.
- TGF- β induce el programa EMT en células epiteliales transformadas con H-Ras. La inhibición de NF κ B revierte el fenotipo inducido TGF- β .
- Twist se expresa en carcinomas de seno lobulares invasivos. La supresión de su expresión reduce la metástasis *in vivo*. Por otra parte, la expresión ectópica de Twist promueve EMT, la expresión de marcadores asociados al fenotipo mesenquimal, incrementa la motilidad celular e inhibe la expresión de E-caderina.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios recientes permitieron elucidar la presencia de células troncales cancerosas con la habilidad exclusiva de regenerar tumores, también nombradas como células iniciadoras de tumores [11]. Estas células comparten muchas características con las células troncales normales, incluyendo la capacidad de autorrenovación [6]. Se han identificado células troncales de cáncer en una gran cantidad de cánceres humanos con la capacidad de generar clones *in vitro*, tumores en ratones inmunodeficientes, y recapitular las características del tumor original. En el caso del colon, se identificaron células iniciadoras del cáncer [13-14], y se demostró que el cáncer colorectal se inicia y propaga por medio de un pequeño número de células no diferenciadas tumorigénicas que expresan los marcadores CD34, CD44, CD133, CD24, ALDH, y Lgr5 [15].

Uno de los marcadores del fenotipo troncal en el epitelio del colon es la actividad de la vía de señalización Wnt y representa una mutación activadora en el 90% de los casos de cáncer de colon. Al analizar el papel de la vía de señalización Wnt en la homeostasis epitelial, usando el silenciamiento inducido tejido-específico en ratones adultos, se observó que el silenciamiento de la señalización Wnt/ β -catenina resulta en la rápida pérdida de las células en la zona de amplificación, de la estructura de la cripta y conduce a la diferenciación terminal de las células troncales bloqueando la homeostasis intestinal y la función del intestino [69].

Además del papel de la vía de señalización Wnt en el mantenimiento del fenotipo troncal, múltiples estudios demostraron que las poblaciones troncales prefieren las condiciones hipóxicas tanto *in vitro* como *in vivo*. Aún cuando algunas células troncales son perivasculares, otras ocupan nichos hipóxicos y el fenotipo puede regularse mediante gradientes de O₂. Los ambientes hipóxicos tumorales siempre se han considerado un producto de la vasculatura aberrante originada por la rápida proliferación de la masa tumoral que sobrepasa el suministro vascular. Es fácil identificar zonas de necrosis en cánceres en rápida proliferación. En esos casos, la hipoxia se asocia con la resistencia al tratamiento, la invasión local y a un fenotipo indiferenciado, como se ha observado en tumores sólidos como el neuroblastoma, mama y cervical. Sin embargo, se debe considerar que residir en ambientes hipóxicos permite a las células troncales mantener tasas de

proliferación bajas con ciclos muy lentos y evitar, al mismo tiempo, el estrés oxidativo asociado a tejidos mejor oxigenados. De tal forma, HIF se propone como uno de los candidatos en la regulación de estos mecanismos mediando el arresto del ciclo celular [50].

En estudios *in vitro*, usando condiciones hipóxicas (<5% O₂), existe un punto de regulación entre la disponibilidad de O₂ y la función de las células troncales y precursoras. En ese sentido es importante la conexión reportada entre las señales reguladas por HIF y la vía Wnt en el mantenimiento del fenotipo troncal embrionario. Se observó que HIF-1 α , tiene la capacidad de modular la vía de señalización Wnt bajo condiciones de hipoxia en células embrionarias, incrementando la activación de β -catenina y la expresión de los efectores cascada abajo LEF/TCF. Esa regulación se observa solo en células troncales neurales y no en células diferenciadas. *In vivo*, la actividad de Wnt/ β -catenina se asocia a los nichos troncales hipóxicos en la zona subgranular del hipocampo. La delección de HIF-1 α en este tejido bloquea los procesos regulados por Wnt, incluyendo la proliferación de las células troncales neurales, su diferenciación y maduración, fenómeno que correlaciona con la disminución en la actividad Wnt/ β -catenina en la zona subgranular. La regulación de ambas vías y su comunicación juegan un papel especial en el mantenimiento y regulación del fenotipo troncal a través de la modulación que HIF-1 α ejerce sobre la vía de señalización Wnt [64].

En el cáncer de colon, se demostró que bajo condiciones hipóxicas se inhibe la formación del complejo β -catenina/TCF-4 y su actividad transcripcional, teniendo como consecuencia el arresto del ciclo celular en fase G1 e involucrando la regulación del eje c-Myc-p21. Asociado a este fenómeno se observó que HIF-1 α compite con TCF-4 por la unión con β -catenina. Los complejos HIF-1 α / β -catenina se localizan en regiones promotoras de genes blancos HIF-1 α . Esta respuesta parece sesgarse hacia la transcripción en respuesta a hipoxia y no hacia la vía Wnt para favorecer la quiescencia y supervivencia celular sobre la proliferación [79].

Por otra parte, se ha observado que, HIF-2 α se expresa preferentemente en células cancerosas troncales CD133+ de glioma, revelándose como un regulador

transcripcional único y crítico en la función de las células troncales cancerosas de cerebro. Cuando se silencia, se inhibe la capacidad de autorrenovación, proliferación, sobrevivencia *in vivo* y la dramática atenuación del potencial tumoral de las células troncales en glioma. El descubrimiento de HIF-2 α como regulador de Oct4, así como de varios blancos transcripcionales que mantienen la capacidad de autorrenovación, lo sitúa en una posición transcendente en el mantenimiento del fenotipo troncal. Tras el reporte de que HIF-2 α tiene la capacidad de asociarse y activar el complejo β -catenina/TCF favoreciendo la proliferación de células cancerosas de riñón, fenómeno que se contrapone al descrito para HIF-1 α [70], entender el balance entre la expresión/actividad de cada isoforma HIF α ayudaría a entender cómo se establecen las decisiones celulares cuando el fondo genético se caracteriza por una vía de señalización Wnt constitutivamente activa, pues los factores HIF se demuestran como serios contendientes por el control del programa genético de la célula al modular la actividad tanto de β -catenina como de c-Myc.

Hasta ahora se ha considerado que el papel primordial de las respuestas reguladas por los factores transcripcionales HIF es permitir la adaptación a condiciones hipóxicas a través de la activación de genes que incrementan la tasa glucolítica (con la expresión de genes como Glut1), la angiogénesis (con VEGF) o la regulación del pH (con la Anhidrasa carbonica-IX). Sin embargo, una de las respuestas críticas a hipoxia es el mantenimiento del fenotipo troncal. Varios reportes sitúan a las isoformas HIF α jugando papeles opuestos en la regulación de la activación de β -catenina por lo que nos preguntamos cuáles serían las consecuencias de su desregulación en un fondo genético que implique el programa Wnt constitutivamente activo. Pocos datos hay al respecto del efecto que la coexpresión de HIF-1 α e HIF-2 α tienen en el cáncer, por lo que no es fácil definir las consecuencias que su desregulación tendrá sobre β -catenina. Nosotros esperamos que dado su capacidad de interactuar con β -catenina y regular su actividad la desregulación de su expresión obligará a las células salir de su homeostasis y eso tendrá consecuencias sobre la actividad de la vía Wnt.

HIPÓTESIS

El bloqueo de la expresión de los factores HIF α en células de cáncer de colon afectará negativamente el fenotipo maligno y a la ruta Wnt/ β -catenina

OBJETIVOS

Investigar el efecto que tiene la actividad de los factores transcripcionales HIF α sobre la vía Wnt canónica en el mantenimiento del fenotipo maligno de células de cáncer de colon.

Objetivo 1. Analizar la expresión de HIF α en distintas líneas celulares bajo condiciones de normoxia e hipoxia.

Objetivo 2. Bloquear la actividad transcripcional mediada por HIF disminuyendo su expresión mediante el silenciamiento estable con siRNA (HIF1 α e HIF2 α).

Objetivo 3. Analizar el efecto que tiene el silenciamiento estable de cada isoforma HIF α sobre el fenotipo troncal canceroso: producción de lactato, susceptibilidad a apoptosis, capacidad migratoria y tumorigénica.

Objetivo 4. Analizar el efecto que tiene el silenciamiento estable de cada isoforma HIF α sobre la actividad transcripcional mediada por β -catenina/TCF.

Objetivo 5. Analizar el efecto que tiene el silenciamiento estable de cada isoforma HIF α sobre la expresión de los marcadores CD44, Oct4, CD24 y Citoqueratina 20.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

Los anticuerpos usados fueron los siguientes: aloficocianina-ratón anti-CD44, ratón anti-CD44, ratón anti-CD24 de BD Biosciences (San Jose, CA, USA); ficoeritrina (PE)-ratón anti-CD133 de Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA); ratón anti-HIF-1 α , ratón anti-HIF-2 α , conejo anti-Oct4, Alexa 647-conejo anti-ratón, Cy3-cabra anti-conejo, ratón anti-laminina A/C de Millipore (Billerica, MA); biotina-ratón anti-CXCR4, FITC-ratón anti-HIF-1 α de R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); ratón anti- β -catenina, ratón anti-Citoqueratina 20, conejo anti-E-caderina, conejo anti-Snail 1, ratón anti-vimentina, conejo anti-GSK-3 β , cabra anti-(p-Ser9)-GSK-3 β de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); apc-conejo anti-ratón, FITC-conejo anti-ratón de Molecular Probes, Inc., (Eugene, OR, USA); apc-estreptavidina Biolegend (San Diego, CA, USA). Anticuerpos anti-ratón IgG1 e IgG2b de US Biologicals (Massachusetts, MA, USA) se usaron a la misma concentración que los anticuerpos primarios como control de isotipo en los experimentos en donde se analizó la expresión de HIF-1 α e HIF-2 α por citometría. El estuche comercial de tinción Anexina-V FLUOS de Roche Applied Science (Mannheim, Germany) se uso para la detección de células necróticas y apoptóticas. El antibiótico puromicina y la L-lactato deshidrogenasa se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis. MO, USA). La matriz de Matrigel pobre en factores de crecimiento se obtuvo de BD Biosciences, catálogo 346230. Todos los demás compuestos químicos usados son de grado reactivo.

Plásmidos

Los plásmidos reporteros pTOPFlash y pFOPFlash se obtuvieron en Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). El plásmido control, que portaba un shRNA con una secuencia de nucleotidos aleatoria y no especificaba la degradación de ningun mRNA celular (se hará referencia a él como *secuencia scrambled*), se obtuvo en Santa Cruz Biotechnology. El plásmido vacío pSUPER (control) y los plásmidos portadores de la secuencia de RNA de interferencia para HIF-1 α e HIF-2 α fueron generosamente donados por el Dr. Daniel Chung, su construcción y efectividad se describen en Imamura T, [et al.]. [71].

Cultivo celular

Todas las líneas celulares cancerosas de colon, RKO, SW480 y SW620, y la línea celular de colon no maligna 112CoN usadas en este trabajo se obtuvieron en American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) y fueron cultivadas como se describe previamente [72]. El mantenimiento de las líneas se hizo en una incubadora de CO₂, al 5% de humedad y 20% oxígeno en condiciones de normoxia ó 3% de oxígeno en condiciones de hipoxia. Todas las líneas celulares se autentificaron en enero del 2012 mediante la técnica de Short Tandem Repeat DNA Profiling en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) en la Ciudad de México, México.

Análisis por Western blot

Los lisados totales se obtuvieron a partir de células cultivadas, bajo las condiciones indicadas en el apartado de cultivo celular en la sección de materiales y metodos, al ser tratadas como a continuación se indica. Las células se lavaron con solución salina PBS y se homogenizaron en buffer de lisis (50 mM de Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas y fosfatasas) durante 30 minutos a 4°C, para después centrifugar a 13000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. En los experimentos donde se debían analizar extractos citoplásmicos y nucleares, las células se lisaron con el buffer de lisis para núcleos del estuche comercial Nuclei Isolation Kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del proveedor. Tras la lisis se recuperaron tanto la fracción citoplásmica como las partículas nucleares por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. Los extractos nucleares se obtuvieron lisando las partículas nucleares en buffer de lisis (50 mM de Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas y fosfatasas) durante 30 minutos a 4°C, para después centrifugar a 13000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. La concentración de proteína se determinó en un ensayo de proteína compatible con detergente (Bio-Rad). Muestras de proteína (50 µg en caso de los lisados totales o 100 µg en el caso de los extractos citoplásmicos/nucleares), se sujetaron a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) para después ser transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como se describe previamente [72]. Como control de carga se analizó la cantidad de Actina

en los experimentos realizados a partir de lisados totales. En los western blot realizados a partir de las fracciones celulares se determinó la pureza de las fracciones citoplásmicas o nucleares analizando la expresión β -tubulina o laminina A/C respectivamente.

Inmunoprecipitación

Las células se lavaron con solución salina PBS y homogenizaron en buffer de lisis (50 mM de Tris, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.5% Tritón X-100 e inhibidores de proteasas y fosfatasa) durante 30 minutos a 4°C, para después centrifugar a 13000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. La concentración de proteína se determinó en un ensayo de proteína compatible con detergente (Bio-Rad). Alícuotas de 1 μ g/ml, obtenidas a partir de estos extractos, se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a una concentración de 2 μ g/ml en agitación constante. Después, 25 μ l de proteína sefarosa-A (30%, Calbiochem) se agregaron e incubaron por 2 horas más, bajo las mismas condiciones. Los complejos inmunes se lavaron dos veces con el buffer A (50 mM Tris-HCl, 0.6 M NaCl, pH 8.3); y una vez con buffer B (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.5). Ambos buffers se suplementaron con 0.1 mg/ml de inhibidor de tripsina y 1 mM de PMSF.

Silenciamiento estable de la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α

Para el silenciamiento estable de las formas HIF-1 α o HIF-2 α las células se transfectaron con el plásmido pSuper RNAi para HIF-1 α o bien para HIF-2 α , que fueron construidos y cuya eficiencia fue probada por el Dr. Daniel Chung [71] o con el plásmido control (como control se usaron tanto el plásmido vacío pSuper como aquel que portaba la secuencia scrambled) usando lipofectamina 2000 como lo sugiere el proveedor. Brevemente, las células se transfectaron con 1 μ g del plásmido control o con 1 μ g del pSuper HIF-1 α o pSuper HIF-2 α . Las transfectantes estables se seleccionaron cultivando en 3 μ g/ml del antibiótico puromicina (Sigma) durante dos semanas. Pasado ese tiempo, las poblaciones sobrevivientes se clonaron y trataron con el antibiótico de selección por 2 semanas más. Las clonas se analizaron por citometría de flujo para determinar los

niveles de expresión de HIF-1 α y HIF-2 α . Para mayores detalles consulte el apéndice I.

Análisis por citometría de flujo (FACS)

Las células se desprendieron y disociaron usando una solución de 10mM de EDTA en PBS. La suspensión celular se lavó con PBS y resuspendió en buffer de tinción; PBS con 4% de suero fetal bovino (SFB). En las tinciones de superficie la suspensión celular se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, para después de eliminar el exceso poder incubarlo con un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente. En el caso de las tinciones intracelulares, antes de la tinción con anticuerpos, la suspensión celular se incubó por 30 min. a 4°C con metanol frío. Para las tinciones en núcleos, los núcleos fueron purificados a partir de la suspensión celular usando el estuche comercial Nuclei Isolation Kit (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del proveedor. Para permeabilizar los núcleos, se incubaron por 10 min. a 4°C en 0.1% Tritón X-100 en PBS con 4% de paraformaldehído. Pasado ese tiempo se lavaron y bloquearon en PBS con 4% SFB por 15 minutos a 4°C y tiñeron con anticuerpo anti β -catenina y como secundario se usó anticuerpo anti-ratón acoplado a Alexa 647. Las células, o los núcleos, teñidos con solo el anticuerpo secundario fueron usados como control negativo de tinción. Los análisis fueron realizados por citometría de flujo en FACScalibur (BD biosciences).

Ensayo de medición de lactato

La concentración de lactato en el medio de cultivo de las células cancerosas se cuantificó mediante un ensayo enzimático usando L-lactato deshidrogenasa (LDH; Sigma-Aldrich): el lactato secretado en el medio de cultivo es reducido a piruvato y NADH en presencia de LDH y exceso de NAD. La cantidad de NADH producido en dicha reacción es proporcional a la cantidad de lactato presente en la muestra. Para detectar su concentración, se desproteinizó diluyendo las muestras en relación 1:3 en una solución al 10% de ácido tricloroacético e incubando 5 minutos a 4°C. El precipitado se eliminó por centrifugación a 4000 r.p.m., durante 10 minutos a 4°C. 16.5 μ l de la muestra se incubaron por 30 minutos a 37°C con la mezcla de reacción: 164 μ l buffer Glicina (0.6M Glicina y 0.5M hidrazina, pH 9.2 catálogo G5418 Sigma-Aldrich), 2.5 M NAD, 8 unidades de LDH (Definición

unidad, 1 unidad reduce 1 μmol de piruvato a L-lactato por minuto a pH 7.5 a 37°C). La mezcla se llevó a un volumen total de 500 μl usando H_2O . El cambio de absorbancia se midió a 340 nm. La concentración de lactato se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\text{Lactato (mM)} = \Delta A_{340} \times 0.5/6.22 \times 0.0165 \quad \text{donde:}$$

ΔA_{340} = Absorbancia máxima a 340 nm 0.5 = Volumen de reacción (mL)

6.22 = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm

0.0165 = Volumen (mL) de la muestra en la cubeta

Apoptosis

Células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de 1.5×10^5 células por pozo. 24 horas después se incubaron en presencia o ausencia de 1mM H_2O_2 por 12 horas a 37°C. La apoptosis se midió por citometría de flujo usando el estuche comercial Annexin-V-FLUOS (Roche) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El grado de necrosis se midió usando yoduro de propidio (PI). Brevemente, tras el estímulo apoptótico, las células se trataron por 3 minutos con una solución 10mM de EDTA en PBS para desprenderlas y disociarlas. Después de ese tratamiento se lavaron con PBS e incubaron en 10 μl de la solución de tinción: 20 μl de reactivo Annexin-V-FLUOS y 20 μl de PI en 1 ml de buffer de incubación. Las muestras se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo usando el programa Cell Quest en el citómetro FACScalibur (BD)

Ensayo de cierre de herida (wound healing)

Células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α se sembraron a confluencia en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina y cultivaron en DMEM-F12 suplementado con 5% de suero fetal bovino. Después de 24 horas se realizó una herida usando una punta estéril de micropipeta y el detrito se eliminó lavando al menos tres veces consecutivas con PBS. En este punto los márgenes de la herida se fotografiaron (t=0 h). A partir de ese momento las células se cultivaron en medio suplementado con 0.05% de suero fetal bovino por las siguientes 72 horas. Los márgenes se fotografiaron cada 24 horas.

Ensayo de migración.

La respuesta quimiotáctica al factor derivado de células estromales (por sus siglas en inglés, stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) se analizó en las células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o bien HIF-2 α sujetándolas a migración en cámaras Boyden (3 μ m tamaño de poro). Un total de 1×10^5 células se sembraron en la parte superior de la cámara en medio suplementado con 0.05% de suero fetal bovino, mientras que la parte inferior contenía SDF-1 α (200 ng/ml en medio suplementado con 0.05% de suero fetal bovino). Como control las células se sometieron a migración en ausencia del factor SDF-1 α . Los números absolutos de las células que migraron se obtuvieron analizando un volumen predeterminado (200 μ l) de cada muestra para todas las condiciones en el citómetro Attune (Applied Systems).

Xenotransplantes de tumor en un modelo murino

1×10^6 células SW480 control o silenciadas establemente para HIF-1 α o HIF-2 α se transplantaron por inyección subcutánea en ratones inmunocomprometidos. Tras determinar viabilidad celular, usando azul de tripano y no teniendo porcentajes menores al 98% en todas las condiciones, se prepararon los transplantes resuspendiendo las células en Matrigel pobre en factores de crecimiento llevado a una concentración del 50% en PBS. Los transplantes se realizaron en los flancos dorsales de ratones desnudos hembras de seis semanas de edad (n=5). Cada ratón se inyectó en el flanco superior derecho con las células control, en el flanco inferior derecho con las células silenciadas para HIF-1 α y en el flanco inferior izquierdo con las células silenciadas para HIF-2 α . En el caso de los xenotransplantes de las células CD44-/CD133- o CD44+/CD133- las subpoblaciones se identificaron y purificaron por tinciones de superficie y separación celular en el citómetro de flujo FACSAria (BD Biosciences). 1×10^4 células se inyectaron, por condición, resuspendidas en Matrigel pobre en factores de crecimiento llevado a una concentración del 50% en PBS. Los transplantes se realizaron en los flancos dorsales de ratones hembras desnudos de seis semanas de edad (n=5). Cada ratón se inyectó en el flanco inferior derecho con células SW480 CD44-/CD133- y en el flanco inferior izquierdo con células SW480 CD44+/CD133- para cada condición (control, HIF-1 α silenciadas o HIF-2 α

silenciadas). Cuatro semanas después de la inyección (para las células derivadas de las líneas celulares RKO y SW480) o bien dos semanas después (para las células derivadas de la línea celular SW620) los ratones se sacrificaron por intoxicación con monóxido de carbono y los tumores se removieron quirúrgicamente y se pesaron.

Transfección y ensayo de gen reportero

Las células se sembraron en placas de 24 pozos a una densidad de $1.2-1.8 \times 10^5$ células por pozo en medio suplementado al 5 o 10% de suero fetal bovino, dependiendo de la línea celular y siguiendo las indicaciones de ATCC. 24 horas después, el medio se reemplazó por medio de cultivo libre de suero y las células se transfectaron usando 1 μg de plásmido reportero (pTOPFlash) o plásmido control (pFOPFlash) y 0.05 μg del plásmido pRL-Luc (control de transfección). 24 horas postransfección se midió la actividad de Luciferasa en los lisados celulares usando el estuche comercial Ensayo doble de Luciferasa (Promega). La actividad se normalizó con respecto a la actividad de Luciferasa de *Renilla* cuya expresión es dirigida por el plásmido usado como control de transfección, pRL-Luc y las mediciones se realizaron usando 20 μg de muestra e igualando el volumen entre ellas usando buffer de lisis en los casos necesarios.

Ensayo de inmunofluorescencia

Las células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α se sembraron a confluencia en cubreobjetos recubiertos con poli-L-lisina y cultivadas en DMEM-F12 suplementado con 5% de suero fetal bovino por 24 horas. Pasado ese tiempo se lavaron con PBS y fijaron con una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a 4°C protegiendo de la luz. Tras eliminar el exceso de paraformaldehído las células se lavaron con PBS y permeabilizaron con una solución de Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente en agitación horizontal suave, 25 r.p.m. Después de permeabilizar se lavaron con PBS y bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación horizontal suave, 25 r.p.m., con una solución de BSA al 0.5%, 0.01% Tritón X-100 en PBS (buffer de bloqueo). Pasado ese tiempo se incubó con los anticuerpos primarios. Se uso una dilución 1:100 para los anticuerpos ratón anti- β -

catenina y conejo anti-E-caderina y 1:50 para los anticuerpo ratón anti-Vimentina y conejo anti-Snail 1 diluidos en buffer de bloqueo toda la noche a 4°C. El exceso de anticuerpo se eliminó lavando con PBS e se incubó una hora a temperatura ambiente protegiendo de la luz con los anticuerpos secundarios anti-ratón Alexa 647 y anti-conejo Cy3 diluidos 1:200 en buffer de bloqueo. Para eliminar el exceso de anticuerpo las laminillas se lavaron con una solución de BSA al 0.05%, 0.001% Tritón X-100 en PBS y finalmente se realizó un lavado con agua previo al montaje de las muestras con VectaShield-DAPI. La emisión de fluorescencia se analizó por microscopia confocal (microscopio Leica TCS SP5, láser kriptón y argón). Como controles de tinción, las células se incubaron solo con anticuerpos secundarios a la misma concentración usada en las muestras problema y se analizaron para confirmar la ausencia de emisión de fluorescencia en estas muestras.

Análisis estadístico

Los datos se presentaron como la media o la mediana \pm el error estándar (SEM, por sus siglas en inglés Standard Error of the Mean, Standard Error of the Median). La mayoría de los datos presentados se sujetaron a un análisis estadístico mediante una prueba t de Student. Un valor de probabilidad $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Para los datos obtenidos en los xenotransplantes de tumor se realizó un análisis de varianza de una vía acompañado por el análisis *post hoc* de la prueba de Tukey.

Consideraciones éticas

Todos los animales se manejaron bajo el respeto estricto de los lineamientos de bioética para la experimentación animal establecidos por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán donde se realizaron los transplantes y sacrificios con CO₂. Los cadáveres fueron tratados e incinerados respetando los lineamientos establecidos por el comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

"2014, Año de Octavio Paz"

México, D. F., a 13 de octubre del 2014.

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Coordinador del Depto. de Bioquímica
Presente.

REF: CINVA 1289, Clave: BQO-1289-14/14-1

Estimado Dr. Zentella:

Habiendo analizado por segunda ocasión el Protocolo de Investigación Experimental titulado:

"EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE UNA INTERVENCIÓN NUTRICIONAL Y AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER."

Este comité ha dictaminado **APROBAR** el protocolo

Sin más por el momento quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba, Director de Investigación
Dra. Ma. Elena Flores, Jefe del Bioterio.

Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Sección XVI
Delegación Tlalpam
México, D. F. 14000
Tel. 152154870900
www.incmnsz.mx

RESULTADOS

En condiciones de normoxia HIF-1 α e HIF-2 α se expresan en las células de cáncer de colon pero no en células no malignas. La hipoxia es una condición muy común en un amplio rango de tumores sólidos. La sobreexpresión de HIF frecuentemente se asocia a metástasis y a un mal pronóstico. *In vivo*, la hipoxia es un componente del nicho de las células troncales normales. Sin embargo, no se ha definido la importancia de un ambiente hipóxico en el mantenimiento de las células troncales cancerosas [73]. Dado que se han detectado altos niveles de expresión de los factores HIF α aún bajo condiciones de normoxia en células tumorales [74], analizamos por western blot su expresión tanto en células no malignas (112CoN) como en líneas celulares de cáncer de colon (RKO, SW480, SW620) bajo condiciones de normoxia y de hipoxia. Los resultados en la figura 8 muestran, como se esperaba, que los niveles de expresión de los factores HIF α se induce bajo condiciones de hipoxia (3% O₂) tanto en las células normales como en aquellas cancerosas. Sin embargo, bajo condiciones de normoxia (20% O₂) sólo las células cancerosas coexpresan tanto a HIF-1 α como a HIF-2 α .

El silenciamiento estable del factor HIF-1 α disminuye la producción de lactato en las células cancerosas sólo bajo condiciones de normoxia. Esto no ocurre en el caso de células silenciadas establemente para el factor HIF-2 α . Buscando entender el papel que juegan los factores HIF en el mantenimiento del fenotipo maligno y su posible interacción con la vía de señalización Wnt canónica usamos la técnica del silenciamiento mediante siRNA para HIF-1 α e HIF-2 α en las células SW480, donde la vía de señalización Wnt canónica está activa constitutivamente. Los plásmidos usados en este estudio fueron donados por el Dr. Daniel Chung, quien los construyó y probó exitosamente [71]. Las células SW480 transfectadas con el plásmido vacío o con la forma scrambled, fueron usados como controles, o bien se transfectó con el plásmido pSuper RNAi HIF-1 α o pSuper RNAi HIF-2 α . Las transfectantes estables fueron seleccionadas por dos semanas con antibiótico y la población sobreviviente fue clonada y

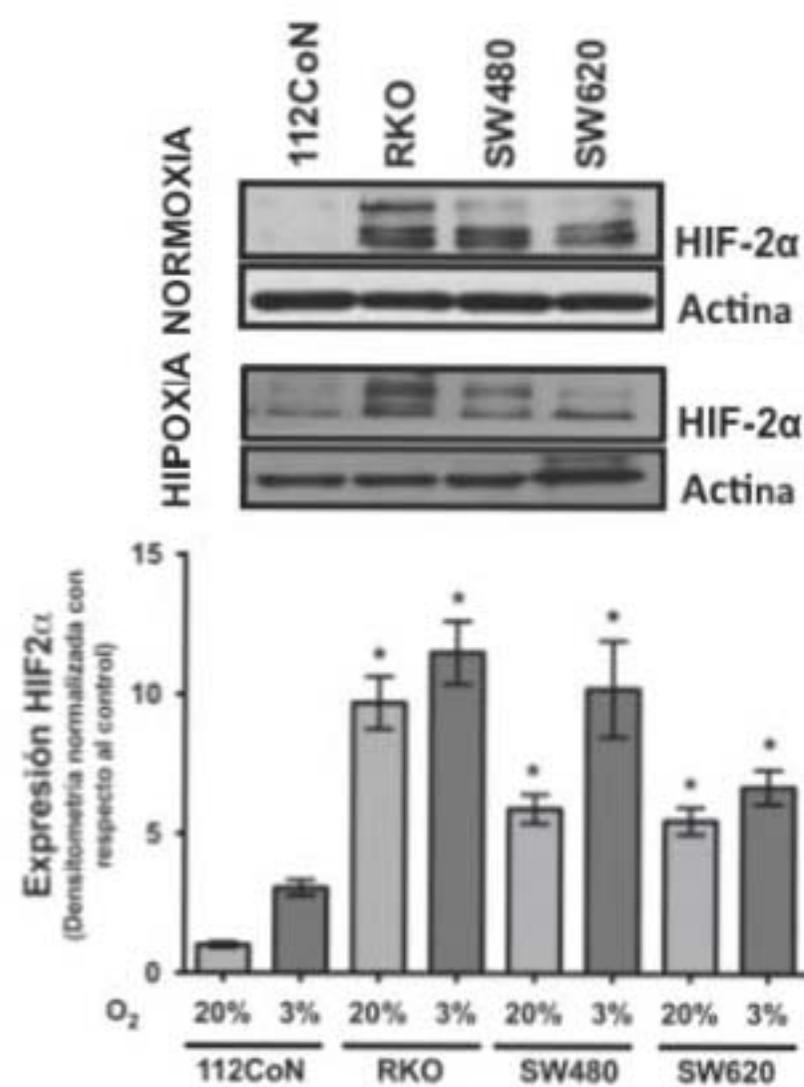
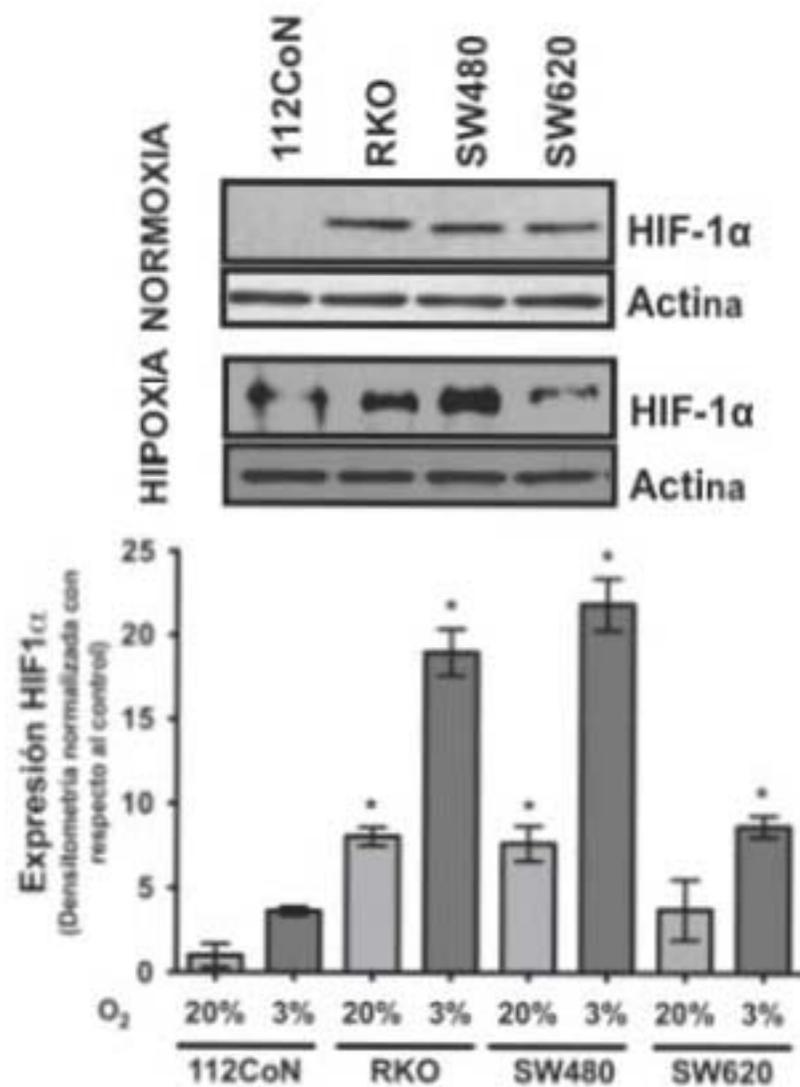


Figura 8. Las células de cáncer de colon, bajo condiciones de normoxia, coexpresan HIF-1 α e HIF-2 α , pero las células normales no los expresan. Células de colon normales (112CoN) o células de cáncer de colon fueron cultivadas bajo condiciones de normoxia (20% O₂) o hipoxia (3% O₂) por 12 h. Se prepararon extractos totales y las muestras fueron sujetas a 10% SDS-PAGE y transferidas a membranas de nitrocelulosa. El análisis por inmunoblot fue realizado usando anticuerpos anti-HIF-1 α y anti-HIF-2 α y revelados usando un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Como control de carga fue analizada la cantidad de Actina presente en cada muestra. El análisis densitométrico se desarrolló para estimar los niveles de expresión de cada proteína en relación a los niveles de expresión detectados en las células normales 112CoN (Eje y en la gráfica: Densimetría normalizada con respecto al control). Todos los ensayos se desarrollaron por triplicado y los datos se presentan como la media \pm SEM. *p<0.05

seleccionada por otras dos semanas. Los niveles de expresión en las clonas fueron analizados por citometría de flujo y fueron seleccionadas aquellas clonas que exhibieran los niveles de expresión más bajos, para HIF-1 α e HIF-2 α respectivamente, en comparación con las células control. La expresión de HIF-1 α en las clonas seleccionadas disminuyó en un 85% mientras que para HIF-2 α fue de aproximadamente un 90%, el análisis de los niveles de expresión se realizó mediante citometría de flujo y las gráficas correspondientes se muestran en la figura 9A.

Se ha descrito que los factores HIF dirigen adaptaciones que permiten a las células cancerosas sobrevivir y eventualmente proliferar en ambientes hipóxicos. Tales adaptaciones incluyen la regulación de la angiogénesis, proliferación, inestabilidad genética, invasión de tejido, metástasis, regulación del pH, glicólisis aeróbica y apoptosis [77]. Las células cancerosas incrementan la glucólisis y la producción de lactato y disminuyen el consumo de O₂ en comparación con células normales, fenómeno que se conoce como efecto Warburg [41, 78]. Consistente con la descripción de este fenómeno, en la figura 9B se muestra un incremento significativo en la producción de lactato en las células de cáncer de colon SW480 y RKO en comparación con las células normales 112CoN. Estos datos sugieren que la expresión de ambos factores está estabilizada (figura 8) y son transcripcionalmente activos (figura 9B). Tras el silenciamiento de los factores HIF α , en las células de cáncer de colon SW480, se observa que disminuye la cantidad de lactato producido bajo condiciones de normoxia. Como se observa en la figura 9C, el silenciamiento de HIF-1 α disminuye la producción de lactato en 50% comparado con las células control bajo condiciones de normoxia, mientras

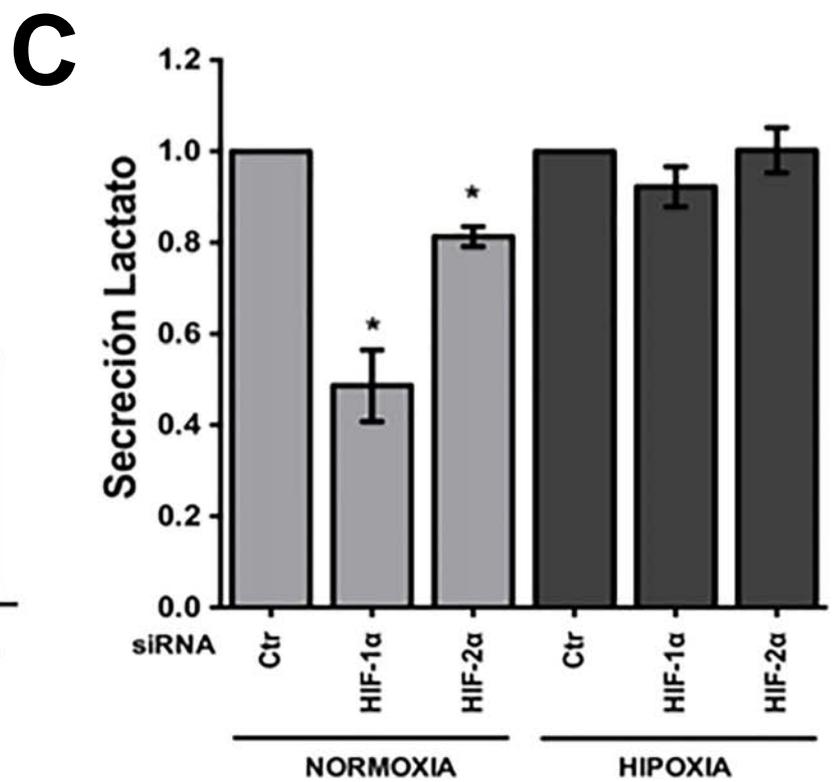
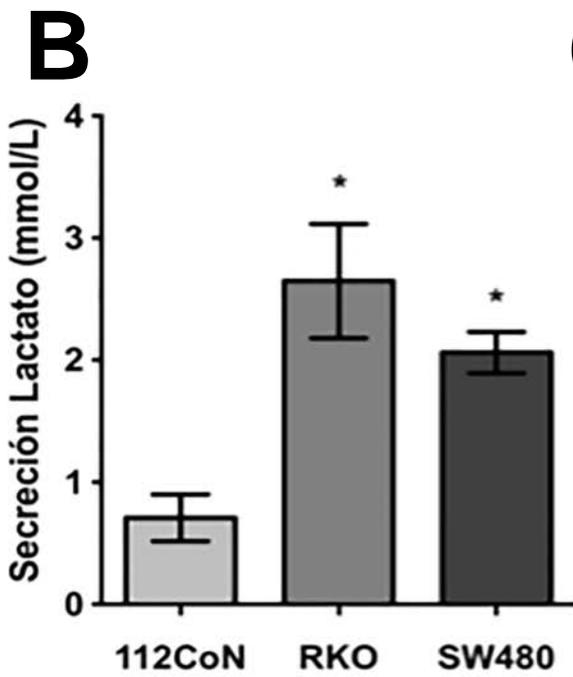
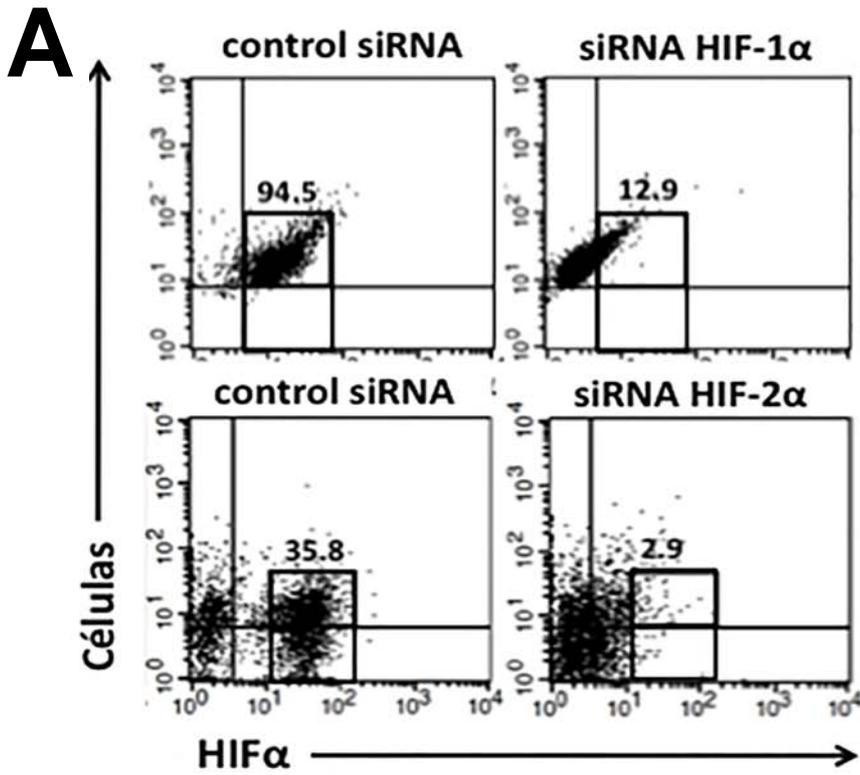


Figura 9. El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α disminuye la producción de lactato en las células de cáncer de colon. A) Niveles de expresión de HIF-1 α o HIF-2 α en células en donde se silenció establemente su expresión. Las células fueron transfectadas con plásmido control (scramble shRNA) o con siRNA para HIF-1 α o para HIF-2 α , como se describe en materiales y métodos. Las clonas seleccionadas fueron analizadas por citometría de flujo para la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α . **B)** Las células cancerosas secretan más lactato que las células normales. La cantidad de lactato secretada en el sobrenadante fue determinada por un ensayo de actividad de LDH como se escribe en materiales y métodos. **C)** Diferencias observadas en la secreción de lactato en las células SW480 control (Ctr) o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α cultivadas bajo condiciones de normoxia (20% O₂) o hipoxia (3% O₂) por 12h. Todos los ensayos se desarrollaron por triplicado y los datos se presentan como la media \pm SEM. *p<0.05

que sólo disminuyó en un 20% como resultado del silenciamiento de HIF-2 α con respecto a las células control bajo las mismas condiciones. El mismo fenómeno fue analizado bajo condiciones de hipoxia, en donde el cultivo celular se sujeta a una exposición aguda al 3% de O₂ durante 12 horas. Como consecuencia de este tratamiento los niveles de expresión de los factores HIF α se incrementan (figura 8) y la producción de lactato regresa a niveles basales (figura 9C). En consecuencia, y con la finalidad de evitar variaciones en los niveles de expresión de los factores HIF α que afecten la eficiencia del silenciamiento y dificulten el análisis del papel que desempeñe cada factor HIF α , en el mantenimiento del fenotipo maligno, decidimos realizar la mayoría de los experimentos bajo condiciones de normoxia. En aquellos experimentos realizados bajo condiciones de hipoxia, se debe considerar que los patrones de expresión cambian y que la regulación y actividad pueden modificarse bajo tales condiciones, como ya se ha reportado [79].

El silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α incrementa los niveles basales e inducidos por H₂O₂ de apoptosis en las células de cáncer de colon SW480.

Se sabe que HIF-1 α induce la expresión de diferentes genes cuyos productos guían la respuesta adaptativa a hipoxia pero, más allá de esa respuesta protectora, se ha observado que, dependiendo del tipo celular y las condiciones experimentales, HIF-1 α puede tanto bloquear como promover la apoptosis. Por lo tanto decidimos explorar el efecto que el silenciamiento de la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α pudiera tener en la apoptosis de células SW480 que expresan

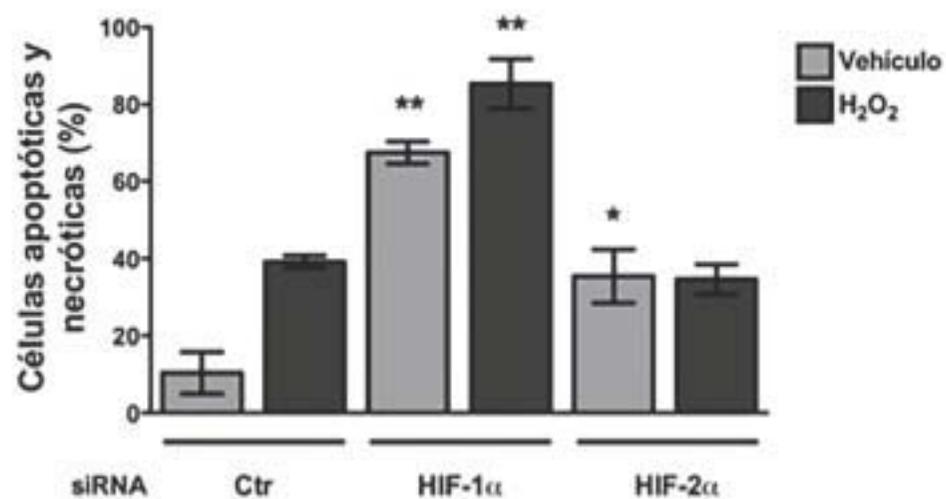
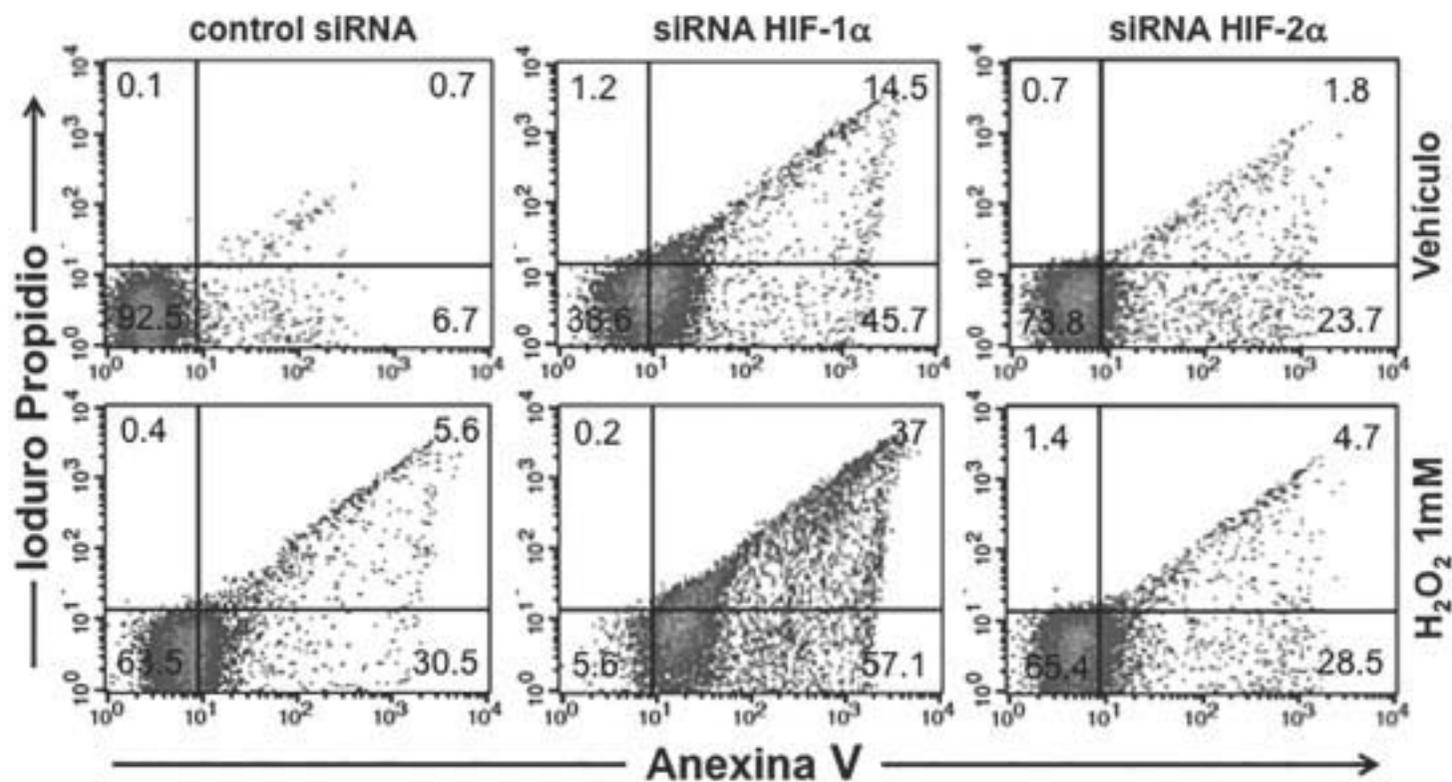


Figura 10. El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α incrementa los niveles de apoptosis en las células de cáncer de colon SW480. Análisis de la apoptosis inducida por H₂O₂ en células SW480 control (Ctr) o silenciadas establemente para HIF-1 α o HIF-2 α . La apoptosis fue inducida cultivando las células en ausencia o presencia de 1 mM H₂O₂ por 12 h. El cultivo fue teñido con Anexina V-Cy3 y PI como se describe en materiales y métodos y analizada por citometría de flujo. Todos los ensayos se desarrollaron por triplicado, se muestra solo un gráfico de puntos representativo, y los datos se presentan como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. *p<0.05 **p<0.01

constitutivamente ambas formas bajo condiciones de normoxia. Usamos peróxido de hidrógeno para inducir apoptosis aguda, pues produce estrés oxidativo severo y tiene como consecuencia inhibir la acumulación de HIF-1 α al afectar su estabilidad [80]. Células SW480, donde se silenció la expresión de los HIF α , fueron tratadas con 1 mM de H₂O₂ por 12 horas. Pasado ese tiempo fueron teñidas con el kit Annexin V-PI como se indica en materiales y métodos y analizadas por citometría de flujo. Como se puede observar, al comparar con los niveles basales, hay un incremento tanto de la apoptosis como de la necrosis bajo condiciones de normoxia como resultado del silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α aún en ausencia del inductor apoptótico (figura 10). Sin embargo, la proporción de células apoptóticas o necróticas obtenida como resultado del silenciamiento de HIF-1 α es mayor que la obtenida por el silenciamiento de HIF-2 α ; y este efecto es más evidente cuando las células son tratadas con 1mM de H₂O₂ (figura 10). Por lo que nuestros resultados sugieren que en células de cáncer de colon los HIF α , particularmente HIF-1 α , promueven la supervivencia celular y la resistencia a apoptosis.

El silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α disminuye la capacidad migratoria de las células SW480, pero sólo el silenciamiento de HIF-1 α afecta severamente la quimiotaxis mediada por CXCR-4. Se ha demostrado, en múltiples estudios de una amplia variedad de tipos de cáncer, que altos niveles de expresión de las subunidades HIF α correlacionan con un pronóstico desfavorable y la disminución en la supervivencia. Pero, por otro lado, se ha demostrado que HIF-1 α puede tanto promover como reprimir migración celular dependiendo de sus niveles de expresión. Se ha observado, que en los bordes de crecimiento se establecen distintas respuestas migratorias asociadas a distintos niveles de expresión de

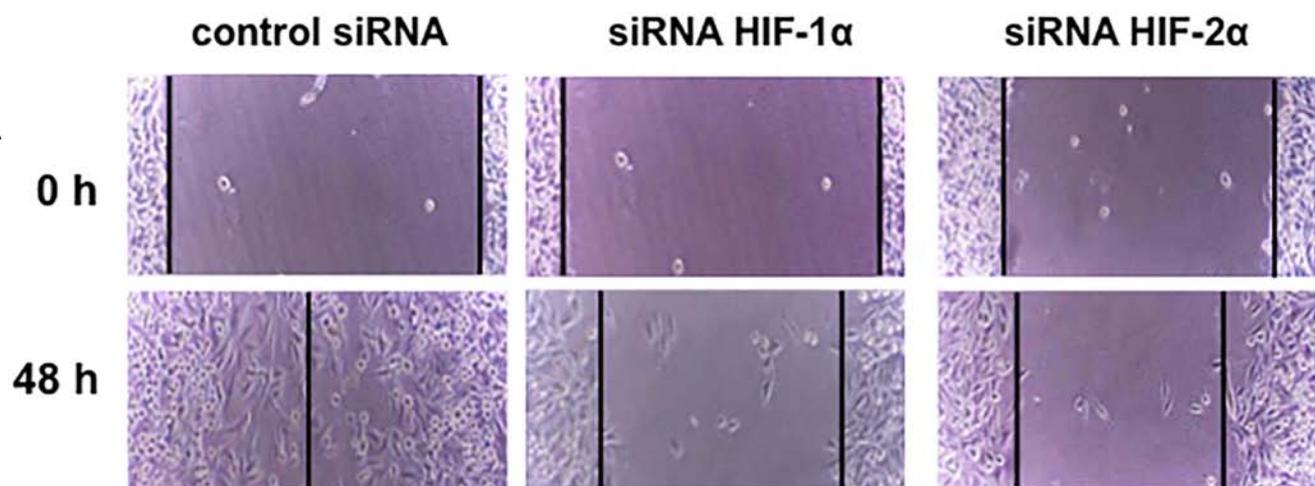
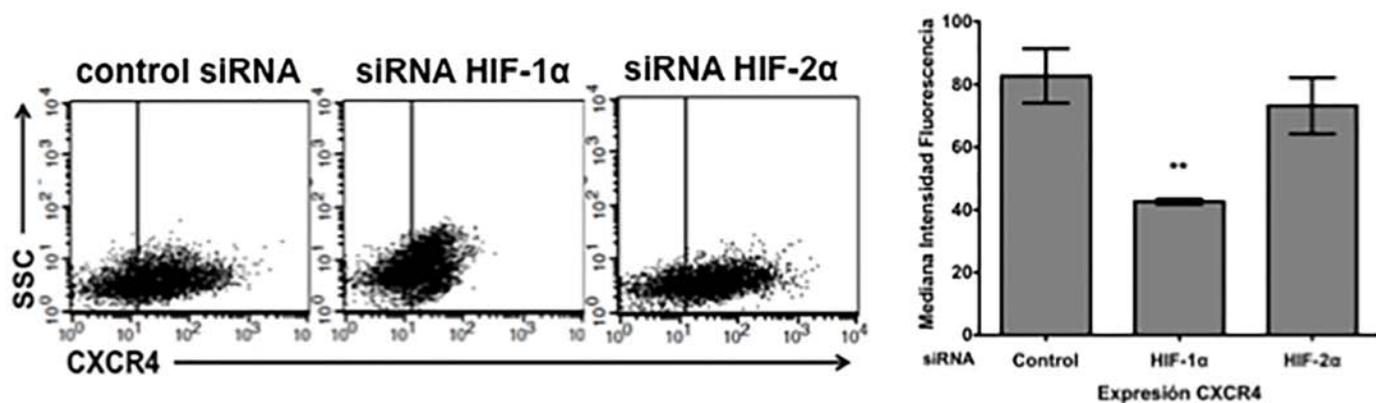
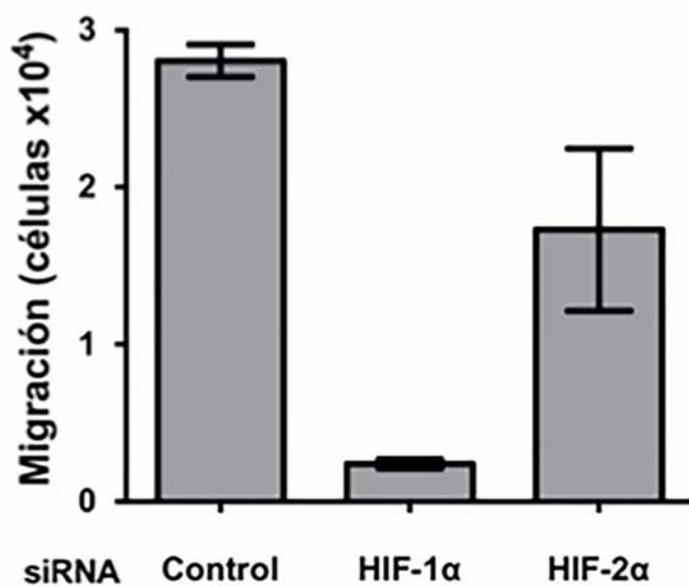
A**B****C**

Figura 11. El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α disminuye la migración de las células de cáncer de colon SW480, pero sólo HIF-1 α afecta de manera severa la quimiotaxis mediada por CXCR4. A) Ensayo de cierre de herida donde se determinó si las células deficientes para la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α migraban. Células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α se crecen a confluencia y se desarrolla el ensayo de cierre de herida como se describe en materiales y métodos. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes y muestran el tiempo 0 (corresponde a la imagen tomada inmediatamente después de generar la herida) y 48 h después. **B)** Cuantificación de los niveles de expresión en membrana del receptor CXCR4. Mediante tinción de superficie y análisis por citometría de flujo se tiñeron a las células SW480 control o deficientes para la expresión los distintos HIF α como se describe en materiales métodos. Los datos se reportan en un gráfico de puntos representativo donde se muestran los niveles de expresión de la población, como SSC, asociados a cambios en la intensidad fluorescencia, CXCR4. Los datos presentados en el gráfico representan la media de la intensidad de la fluorescencia \pm SEM de tres experimentos independientes * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ **C)** Respuesta quimiotáctica a SDF-1 α . El ensayo de quimiotaxis se realizó como se describe en materiales y métodos sometiendo a las células SW480 control o deficientes para la expresión de los HIF α a migración en cámaras de Boyden, en respuesta a un diferencial de concentración de SDF-1 α por 48h en un medio pobre en factores de crecimiento. Los datos representan la media del número de células migrantes \pm SEM de tres experimentos independientes desarrollados por duplicado * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

HIF-1 α revelando un carácter no lineal ni cíclico en su regulación [81]. Por lo cual analizamos la capacidad migratoria de las células SW480 tanto en condiciones normales (control; transfectadas establemente con plásmido vacío), como en aquellas con un nivel de expresión menor tanto de HIF-1 α como de HIF-2 α (silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α ; transfectadas establemente con plásmidos portadores tanto del siRNA para HIF-1 α como para HIF-2 α). Para ello se desarrollaron análisis de cierre de herida (wound-healing) tal y como se escribe en materiales y métodos y los resultados se muestran en la figura 11A. En comparación con las células SW480 control, se observa una clara disminución en la capacidad migratoria de las células cuando en ellas fue silenciada la expresión tanto para HIF-1 α como para HIF-2 α (por favor, observar las líneas dibujadas como límites de referencia en las fotografías). Adicionalmente, se realizaron ensayos de quimiotaxis inducida por SDF-1 α , mediada por su único receptor, CXCR-4. La relevancia de este ensayo radica en la asociación entre la respuesta a ésta quimiocina y la metástasis órgano específica de distintos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon [82]. En la figura 11B se muestra los resultados tras el análisis por citometría de flujo de la expresión en membrana del receptor

CXCR4. Como se puede observar, y ya se ha reportado [43], solo el silenciamiento del factor HIF-1 α disminuye la expresión de CXCR4 y no ocurre esto tras el silenciamiento del factor HIF-2 α . Consistentemente, el silenciamiento de HIF-1 α abate la quimiotaxis mediada por CXCR4 de las células SW480 mientras que el silenciamiento de HIF-2 α disminuye la respuesta quimiotáctica en un 45% \pm 20 con respecto al control, figura 11C.

El silenciamiento de la expresión de los factores HIF-1 α o HIF-2 α disminuye la actividad tumorigénica *in vivo* de células de cáncer de colon injertadas.

Para determinar el efecto que el silenciamiento de los factores HIF α pudiera tener sobre la actividad tumorigénica de células de cáncer de colon, utilizamos un modelo de xenotransplantes en ratones inmunocomprometidos. Analizamos este efecto en líneas celulares representativas del fenotipo de cáncer de colon que exhiben distintos contextos genéticos para Wnt: células de la línea RKO, donde la vía de señalización Wnt canónica es normal (expresan la forma nativa de la proteína APC) y células de la línea SW480 que presentan la vía de señalización Wnt constitutivamente activa (expresan una forma mutante trunca de APC). También utilizamos células de la línea SW620, línea establecida a partir de una metástasis generada del tumor de donde fue derivada la línea SW480. Las células fueron transfectadas establemente con el plásmido control vacío pSuper o con el pSuper siRNAHIF-1 α o pSuper siRNAHIF-2 α y seleccionadas como se describe en materiales y métodos. La eficiencia del silenciamiento fue determinada por citometría de flujo, como se muestra en la figura 12A. Las células con el menor nivel de expresión, tanto para HIF-1 α como para HIF-2 α , fueron inyectadas en los flancos de ratones inmunocomprometidos, NOD/SCID. Las células control en el flanco superior derecho y las células HIF-1 α e HIF-2 α en los flancos inferior derecho e izquierdo, respectivamente. Después de cuatro semanas (para las células RKO y SW480), o dos semanas (para las células SW620²), los ratones

² Acatando las disposiciones del comité de bioética del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” se dio por terminado el experimento, antes del tiempo indicado en el protocolo, en la población de ratones inmunocomprometidos en donde se transplantaron células de cancer de colon SW620 por el daño físico y la grave pérdida de peso que el ensayo generó en cada individuo en experimentación (Apéndice 2).

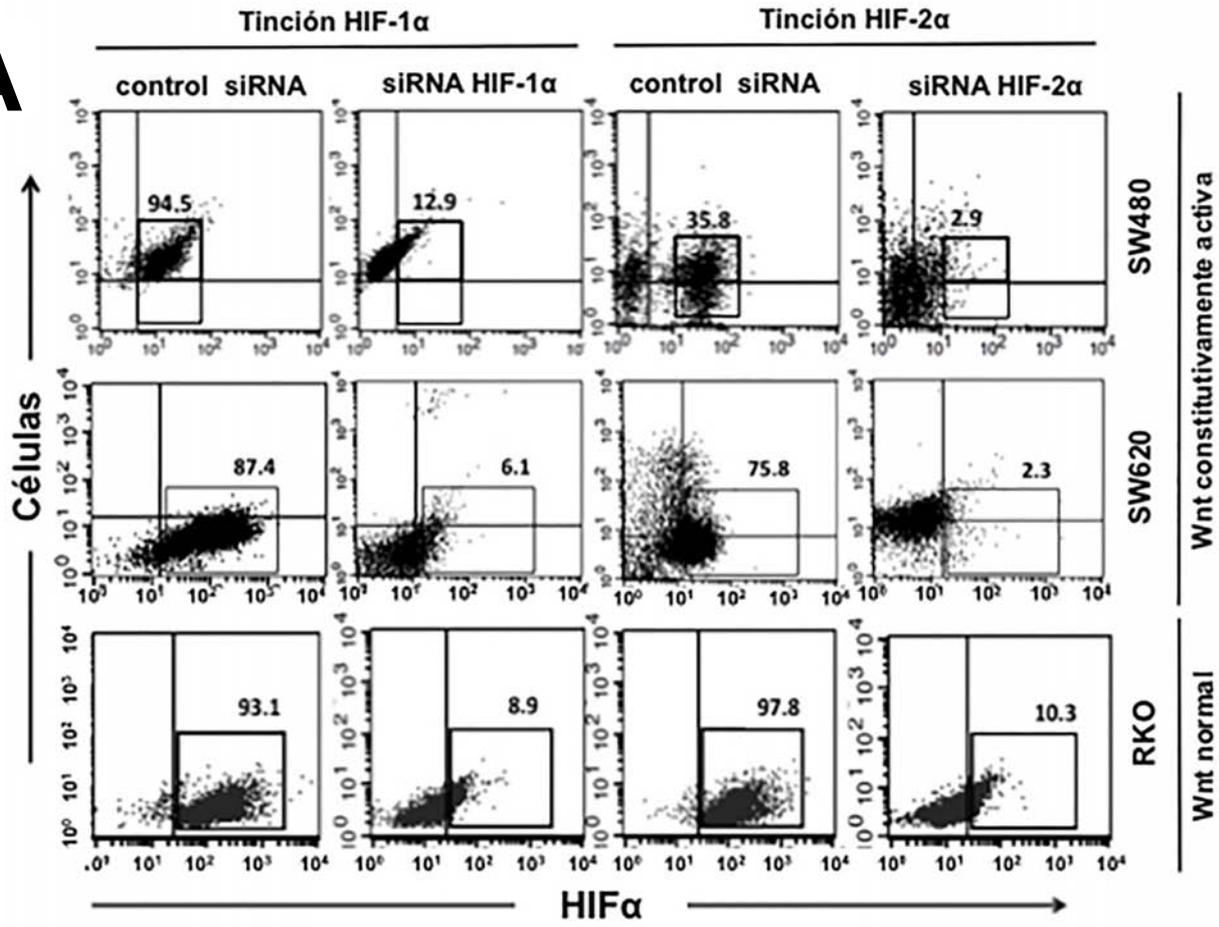
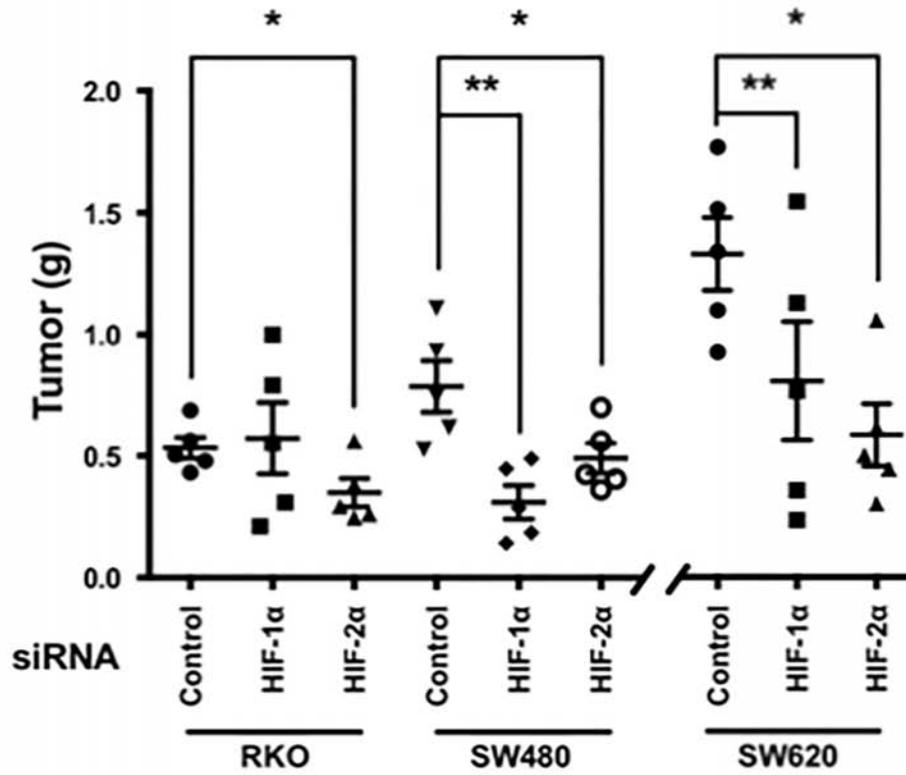
A**B**

Figura 12. El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α disminuye la actividad tumorigénica de trasplantes de células de cáncer de colon. **A)** Niveles de expresión de HIF-1 α o HIF-2 α en células en donde se silenció establemente su expresión. El silenciamiento estable de HIF-1 α o HIF-2 α se desarrolló como se describe en materiales y métodos en las líneas celulares de cáncer de colon RKO, SW480 y SW620. Los niveles de expresión para los HIF α fueron analizados por citometría de flujo para determinar la eficiencia del silenciamiento comparándolas con los niveles de expresión detectados en las células control **B)** Células control o deficientes en la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α en las líneas RKO, SW480 o SW620 fueron inyectadas subcutáneamente en la región dorsal de ratones hembra desnudos inmunocomprometidos de seis semanas de edad (n=5 para cada condición). Cada ratón fue inyectado en el flanco superior derecho con las células control, en el flanco inferior derecho con las deficientes para HIF-1 α y en el flanco inferior izquierdo con las deficientes para HIF-2 α . 1×10^6 células en matrigel pobre en factores de crecimiento fue transplantado en cada sitio. Después de 4 semanas (RKO, SW480) o 2 semanas (SW620²), los ratones fueron sacrificados y los tumores removidos quirúrgicamente y pesados. Los datos representan la media \pm SEM de una muestra con una n=5 para cada condición experimental. Los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis de Anova de una vía acompañada de la prueba *post hoc* de rango Tukey.

fueron sacrificados y los tumores removidos. Como se observa en la figura 12B, los injertos realizados con las células SW480 y SW620, en donde fue silenciada la expresión para HIF-1 α o HIF-2 α , tienen una actividad tumorigénica menor comparados con los controles. Sin embargo, esta relación no se observa en el caso de las células RKO en donde el silenciamiento de HIF-1 α no afecta significativamente la actividad tumorigénica. De hecho, es interesante que los efectos más pronunciados los exhiban las células de cáncer de colon cuya ruta de señalización Wnt canónica está alterada. Particularmente, en la línea SW620 metastásica el efecto observado es mucho más evidente que en aquellos realizados con células malignas no metastásicas, fenómeno asociado a un fenotipo más agresivo. En vista de estos resultados, decidimos analizar el efecto que el silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α podría tener sobre la actividad tumoral de las células troncales de cáncer, CD44+/CD133+ [83-84].

Mediante separación celular por citometría de flujo se aislaron las poblaciones en la línea celular SW480: una población CD44+CD133- y la doble negativa CD44-CD133-, tanto para las células SW480 control como para aquellas donde se silenció la expresión de los factores HIF α , figura 13A. Las poblaciones fueron transplantadas por inyección subcutáneamente en los flancos dorsales inferiores derecho o izquierdo respectivamente. Después de cinco semanas, los ratones

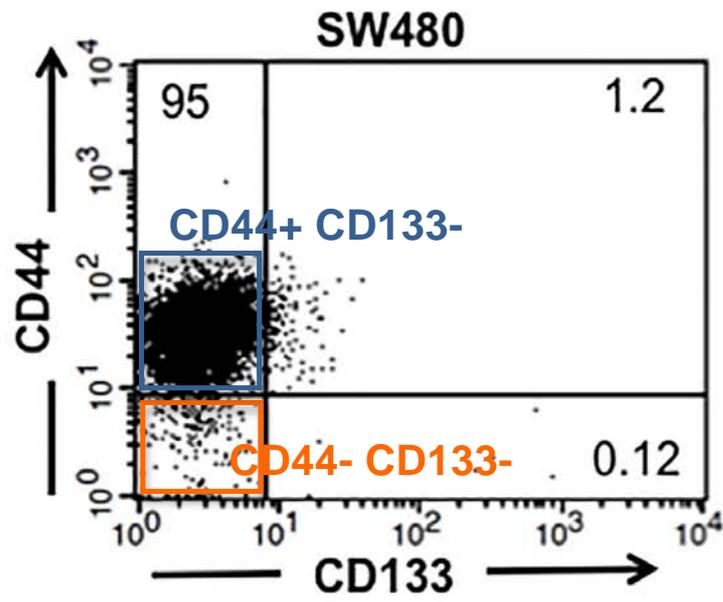
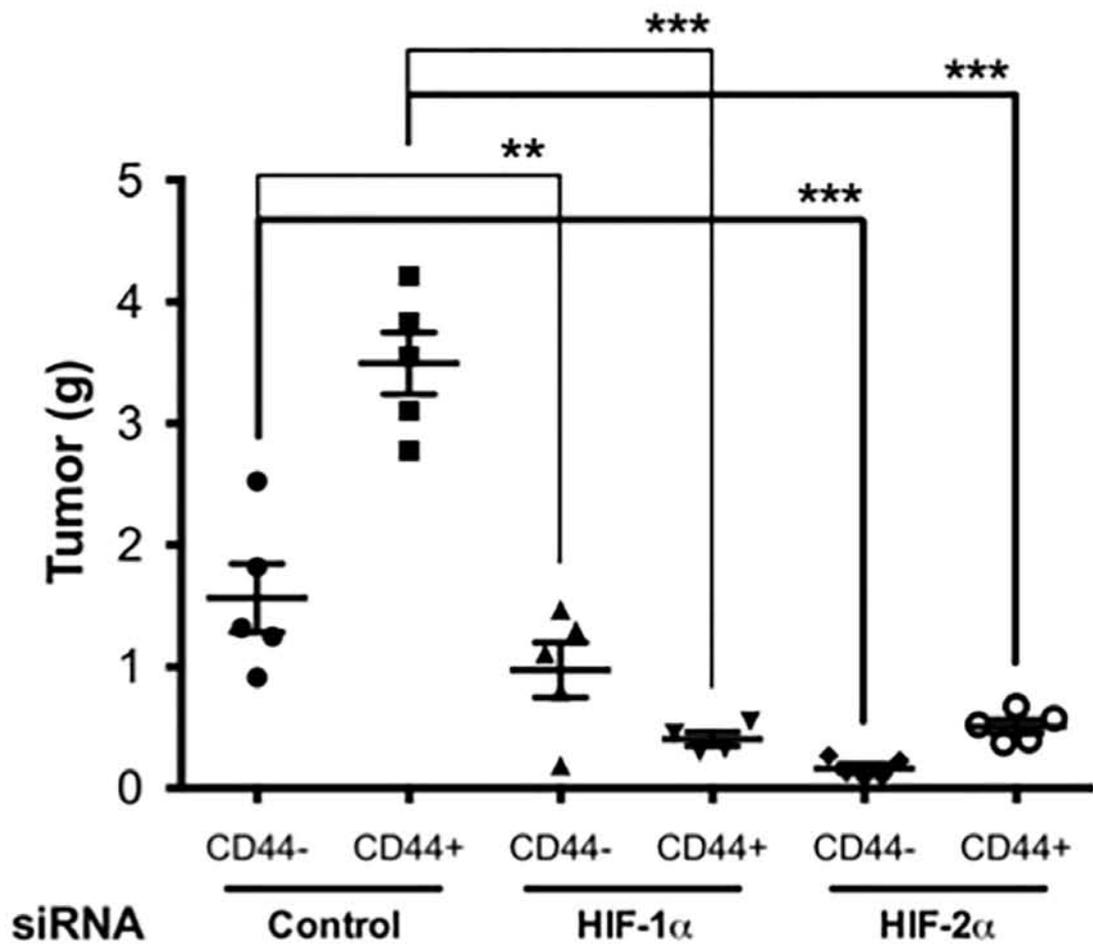
A**B**

Figura 13. Disminución de la actividad tumorigénica *in vivo* en células CD44-/CD133- y CD44+/CD133- aisladas de células SW480 control o deficientes en la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α **A)** Análisis de los niveles de expresión de los marcadores CD44 y CD133 en la línea celular SW480. Las células SW480 fueron teñidas como se describe en materiales y métodos. Los datos se muestran en un gráfico de puntos para la expresión de CD133 y CD44. **B)** Mediante separación celular usando el análisis por citometría de flujo fueron aisladas las poblaciones CD44-/CD133- y CD44+/CD133- a partir de las células SW480 control o deficientes para HIF-1 α o HIF-2 α . Las subpoblaciones purificadas fueron inyectadas subcutáneamente en la región dorsal de ratones hembra desnudos inmunocomprometidos de seis semanas de edad (n=5 para cada condición). Cada ratón fue inyectado en el flanco inferior derecho con células CD44-/CD133- y en el flanco inferior izquierdo con células CD44+/CD133-. 1×10^6 células en matrigel pobre en factores de crecimiento fue transplantado en cada sitio. Después de 5 semanas los ratones fueron sacrificados y los tumores removidos quirúrgicamente y pesados. Los datos representan la media \pm SEM de una muestra con una n=5 para cada condición experimental. Los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y un examen *post hoc*, Anova de una vía acompañada de la prueba de rango Tukey.

fueron sacrificados y los tumores removidos quirúrgicamente y pesados. Los resultados se presentan en la figura 13B. Todos los injertos con las subpoblaciones CD44-CD133- o CD44+CD133- obtenidos a partir del cultivo de las células control produjeron tumores, se observa que la subpoblación CD44+CD133- es más tumorigénica. Notablemente, todos los injertos con las subpoblaciones CD44-CD133- o CD44+CD133- obtenidos a partir de los cultivos de las células cuya expresión para HIF-1 α o HIF-2 α fue silenciada desarrollaron tumores mucho más pequeños, figura 13B. Tomando en consideración todos los datos, nuestros resultados muestran que tanto HIF-1 α o HIF-2 α juegan un papel importante en el establecimiento, crecimiento del tumor y agresividad *in vivo* de las subpoblaciones CD44-CD133- o CD44+CD133- aisladas a partir de la línea celular SW480, cuya vía de señalización Wnt canónica está activa constitutivamente. Estos resultados sugieren que la actividad de los factores HIF α pueden promover tanto el crecimiento como la progresión tumoral, en células con la vía de señalización Wnt constitutivamente activa, de manera independiente a la expresión del marcador asociado al fenotipo troncal canceroso CD44. Es decir, el que las células SW480 expresen o no expresen al marcador CD44 no le confiere ninguna ventaja durante el establecimiento del tumor cuando en esas células se interfiere con la actividad de los factores HIF α .

El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α produce efectos opuestos en la vía de señalización Wnt. La vía de señalización Wnt está implicada en la iniciación y establecimiento del cáncer de colon. Por lo que, tras silenciar la expresión de los factores HIF α , el observar la disminución en la capacidad tumoral en las células de cáncer de colon cuya ruta de señalización Wnt canónica está alterada nos llevó a preguntarnos específicamente sobre las consecuencias que la desregulación en la expresión de HIF α podría tener sobre la actividad de β -catenina. Al respecto se ha reportado que HIF-1 α modula la actividad de Wnt/ β -catenina en células embrionarias bajo condiciones de hipoxia incrementando la actividad de β -catenina y la expresión de los factores transcripcionales cascada abajo LEF-1 y TCF-1 [64].

La comunicación entre la dos vías no va en un solo sentido; se ha demostrado que β -catenina puede regular la actividad transcripcional mediada por HIF-1 α promoviendo la sobrevivencia celular y la adaptación a hipoxia [79], y elementos de la vía de señalización Wnt, como GSK-3 β , regulan directamente la estabilidad de HIF-1 α mediante fosforilación. Inhibiendo o depletando a GSK-3 β se observa un incremento en los niveles de HIF-1 α , mientras que la sobreexpresión reduce los niveles de HIF-1 α [85-86].

Estos hallazgos, y aquellos que evidencian la comunicación cruzada entre ambas vías, sugieren que la vía de señalización Wnt canónica juega un papel dinámico en la regulación transcripcional y evidencia su capacidad para dirigir la adaptación al ambiente tumoral. Consistentemente con estos reportes, nosotros encontramos que tras el silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α , los niveles de la forma inactiva de GSK-3 β , p-Ser9-GSK-3 β , en las células SW480 disminuyen, como puede observarse en la figura 14A. Para poder determinar las consecuencias que tales hallazgos pudieran tener sobre la vía de señalización Wnt canónica analizamos a su principal blanco: el regulador transcripcional β -catenina. Los experimentos los realizamos en células cuya vía de señalización Wnt es normal, células RKO, y en aquellas en donde la vía Wnt está constitutivamente activa, células SW480, bajo condiciones de normoxia e hipoxia. Para ello, utilizamos el sistema reportero TOPFlash/FOPFlash como se describe en materiales y métodos y los resultados se muestran en la figura 14B. Como se puede observar, bajo normoxia, el

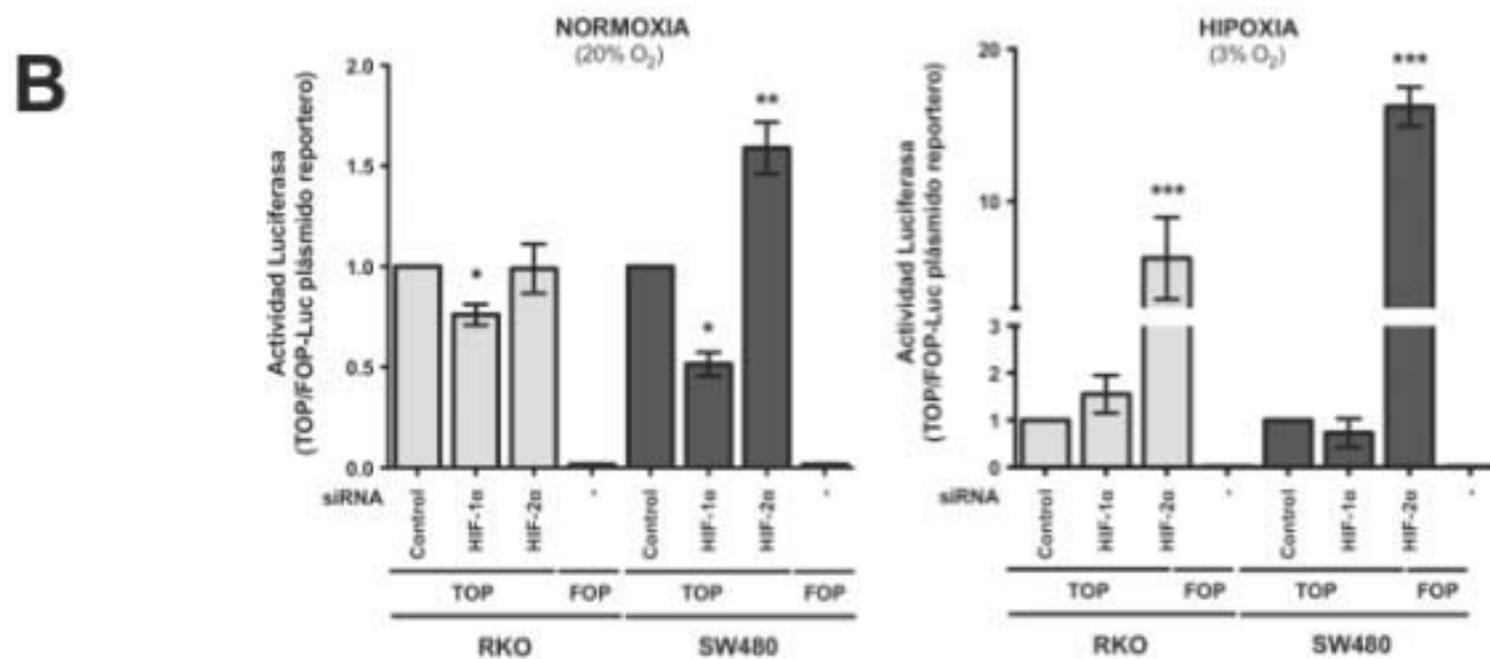
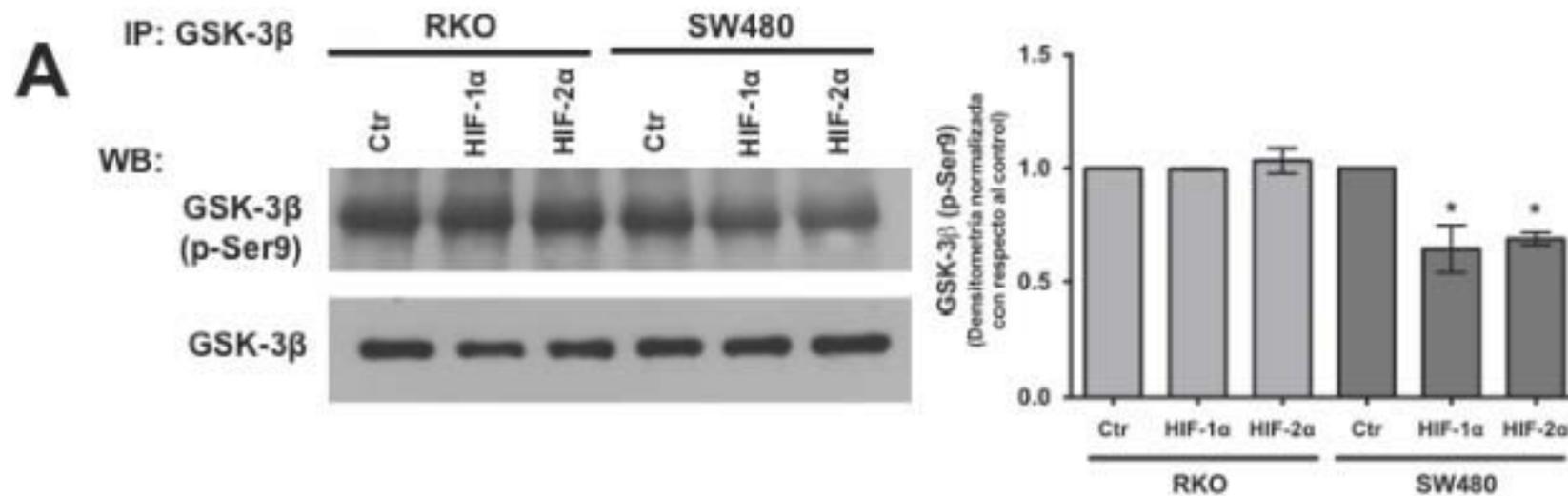
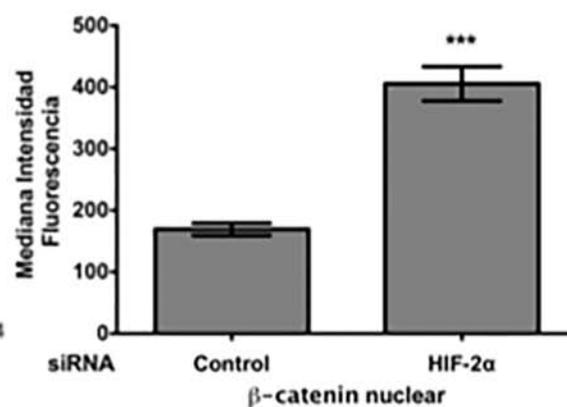
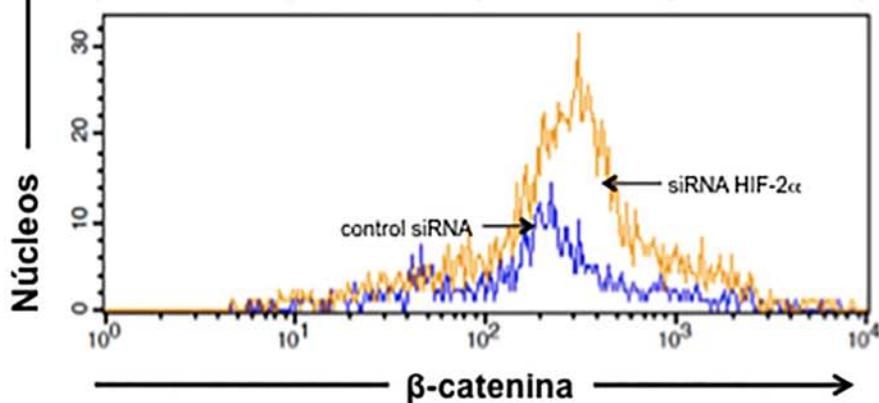
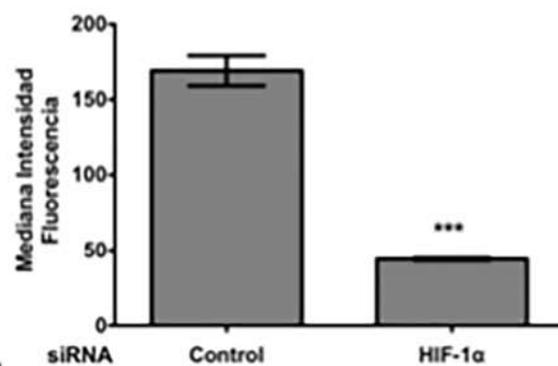
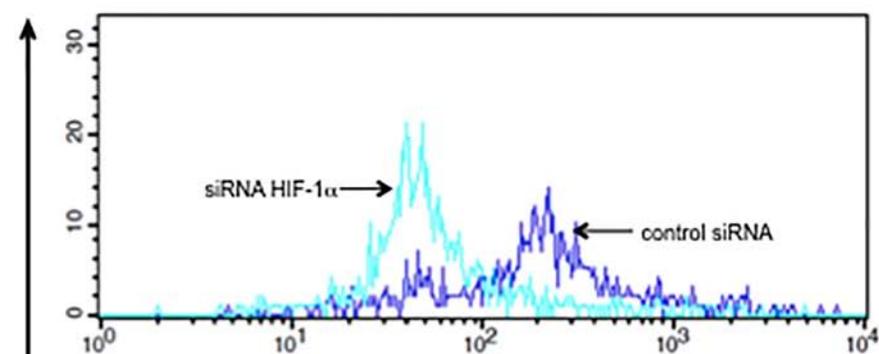
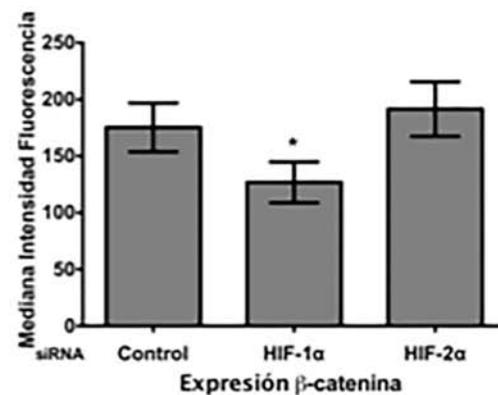
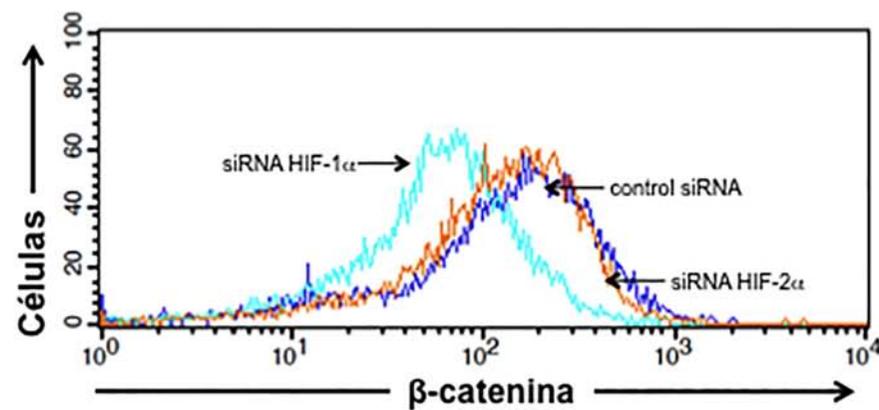


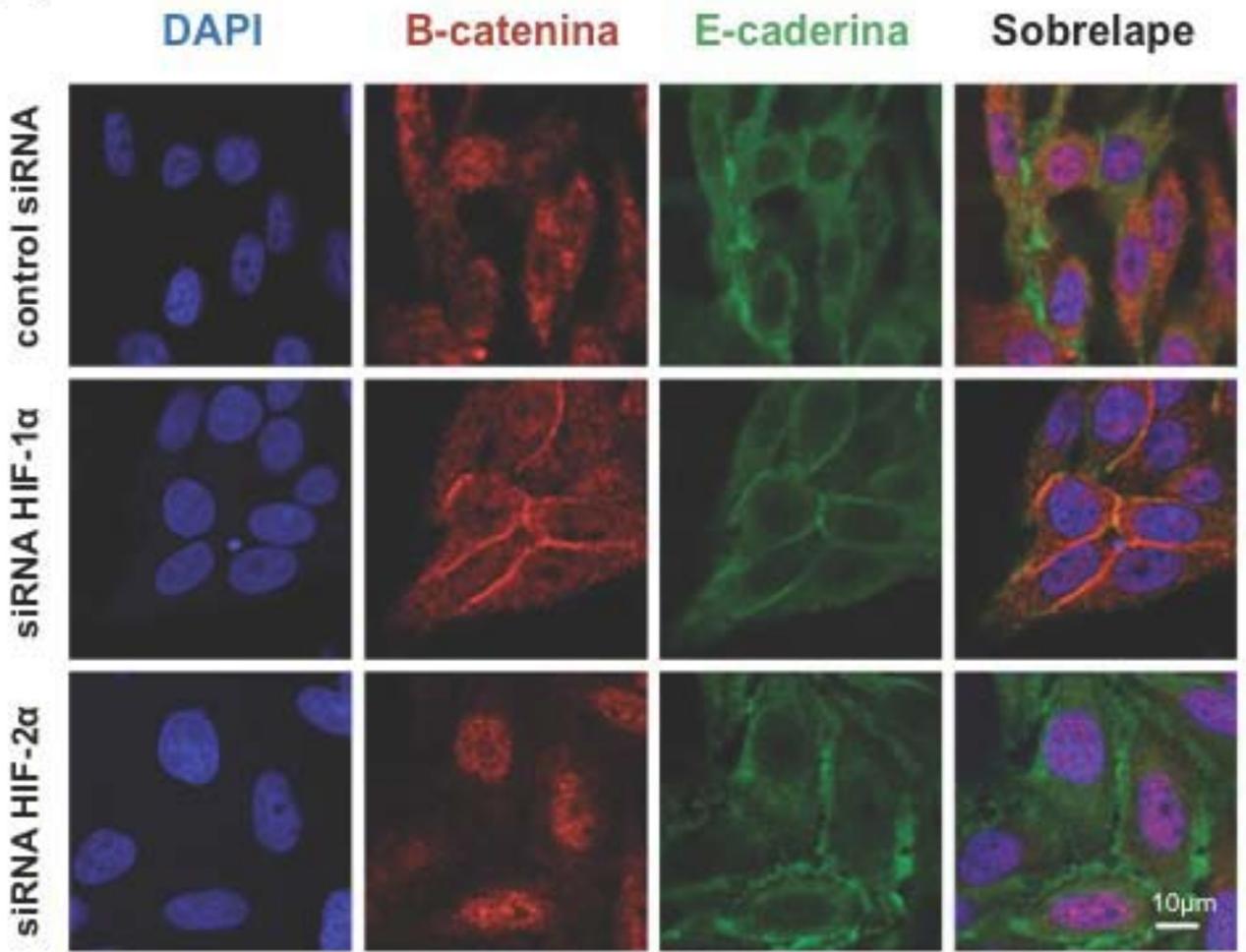
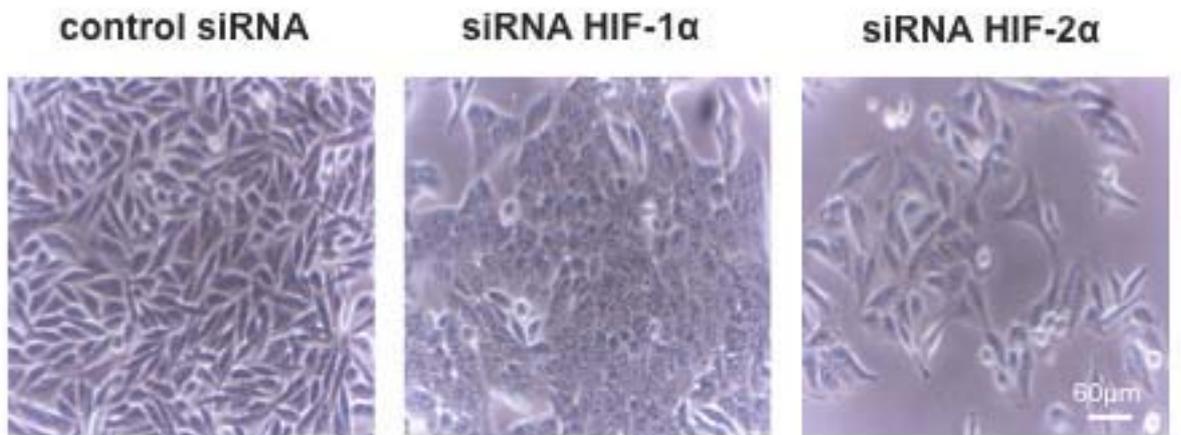
Figura 14. El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α produce efectos opuestos en la vía de señalización Wnt/ β -catenina. A) Análisis por western blot de los niveles de fosforilación en residuo de Serina 9 en la cinasa GSK-3 β . Las células control (Ctr) o silenciadas establemente para expresión de HIF-1 α o HIF-2 α de las células RKO o SW480 fueron cultivadas bajo condiciones de normoxia. Tras lisar las células, extractos totales fueron sujetos a 10% SDS-PAGE y transferidos en membranas de nitrocelulosa. Se analizó por inmunoblot los niveles de GSK-3 β o (p-Ser9)-GSK-3 β como se indica en la figura. Para estimar el nivel de (p-Ser9)-GSK-3 β con respecto al nivel total de GSK-3 β se realizaron análisis densitométricos. Los ensayos fueron desarrollados por triplicado y los datos se presentan como la media \pm SEM de al menos tres ensayos realizados independientemente * $p < 0.05$ **B)** Cuantificación de la actividad transcripcional mediada por β -catenina en células RKO o SW480 control o silenciadas establemente para la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α . Las células fueron transfectadas con los plásmidos reporteros pTOPFlash (Luc-reportero) o pFOPFlash (control). 24 horas postransfección las células fueron incubadas bajo condiciones de normoxia (20% O₂) o hipoxia (3% O₂) por 12h. Tras lisarlas y cuantificar la cantidad de proteína en el sobrenadante, 20 μ g fueron sujetos a un ensayo de actividad de Luciferasa. La actividad fue normalizada con respecto a la actividad de la Luciferasa de *Renilla* o con respecto al contenido de proteína en cada muestra. Todos los ensayos se desarrollaron por triplicado y los datos se presentan como la media \pm SEM de al menos cinco experimentos realizados independientemente * $p < 0.05$

silenciamiento de la expresión de HIF-1 α disminuye significativamente la actividad transcripcional mediada por β -catenina tanto en células RKO como en células SW480. De manera opuesta, el silenciamiento de HIF-2 α incrementa su actividad transcripcional, pero sólo lo hace de manera significativa en las células SW480. Bajo condiciones de hipoxia, el silenciamiento de HIF-1 α no induce cambios significativos en la actividad transcripcional mediada por β -catenina tanto en células RKO como SW480, pero el silenciamiento de HIF-2 α induce un incremento substancial en la actividad transcripcional en ambos tipos celulares (Figura 14B). Intentando explicar el efecto observado sobre la actividad transcripcional mediada por β -catenina primero determinamos los niveles de expresión de β -catenina por citometría de flujo en las células SW480 y después su localización. La figura 15A, panel superior, muestra que de manera consistente con los efectos negativos observados sobre la actividad transcripcional mediada por β -catenina, la expresión de β -catenina disminuyó como resultado el silenciamiento del factor HIF-1 α comparada con la expresión en las células control pero no incrementó como resultado del silenciamiento de HIF-2 α .

Dado que tanto la expresión como la localización de β -catenina son dos mecanismos a través de los cuales sus acciones son reguladas, examinamos los niveles de expresión nuclear de β -catenina como resultado del silenciamiento de los factores HIF α . La cuantificación de la expresión de β -catenina en núcleo obtenidos a partir de células donde fue silenciada la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α se realizó por citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. Nuestros datos muestran (figura 15B, panel inferior) que en las células donde se silenció la expresión de HIF-1 α la expresión de β -catenina nuclear disminuyó en comparación a las células control. En cambio, en aquellas donde se silenció la expresión de HIF-2 α se observa un incremento no sólo en la cantidad de β -catenina nuclear sino también en la cantidad de células que muestran este fenotipo, figura 15B, panel inferior.

Aunado a este análisis se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, que se muestran en la figura 15B, para visualizar la localización de β -catenina. Nuestros resultados muestran que la localización intracelular de β -catenina cambia dramáticamente en respuesta al silenciamiento de HIF-1 α o bien de HIF-2 α . Cuando la expresión de HIF-1 α es silenciada la expresión de β -catenina disminuye en el núcleo y se observa un incremento asociada a la membrana plasmática colocalizando con E-caderina. Cuando la expresión de HIF-2 α es silenciada, β -catenina se localiza esencialmente en el núcleo celular. Aunado a este fenómeno pudimos observar que el silenciamiento de HIF-1 α induce cambios morfológicos asociados al fenotipo epitelial, figura 15C, sugiriendo que el silenciamiento de HIF-1 α induce un cambio en el programa EMT. Para confirmar estas observaciones examinamos los niveles de marcadores asociados al programa EMT por inmunofluorescencia y western blot. Las figuras 15D y 15E muestran que los niveles de los marcadores EMT, vimentina y Snail 1 nuclear, disminuyen como resultado del silenciamiento de HIF-1 α , mientras que la expresión de E-caderina se incrementa y es posible detectar, por western blot, la forma de 120 KDa que corresponde a la forma completa de la proteína capaz de promover interacciones homotípicas y de estabilizar uniones célula-célula [87]. En el caso de HIF-2 α los niveles de proteína son similares, tanto para vimentina como para E-caderina, a aquellos detectados en las células SW480 control. Sin embargo, la expresión nuclear de Snail 1 disminuye como consecuencia del

A

B**C**

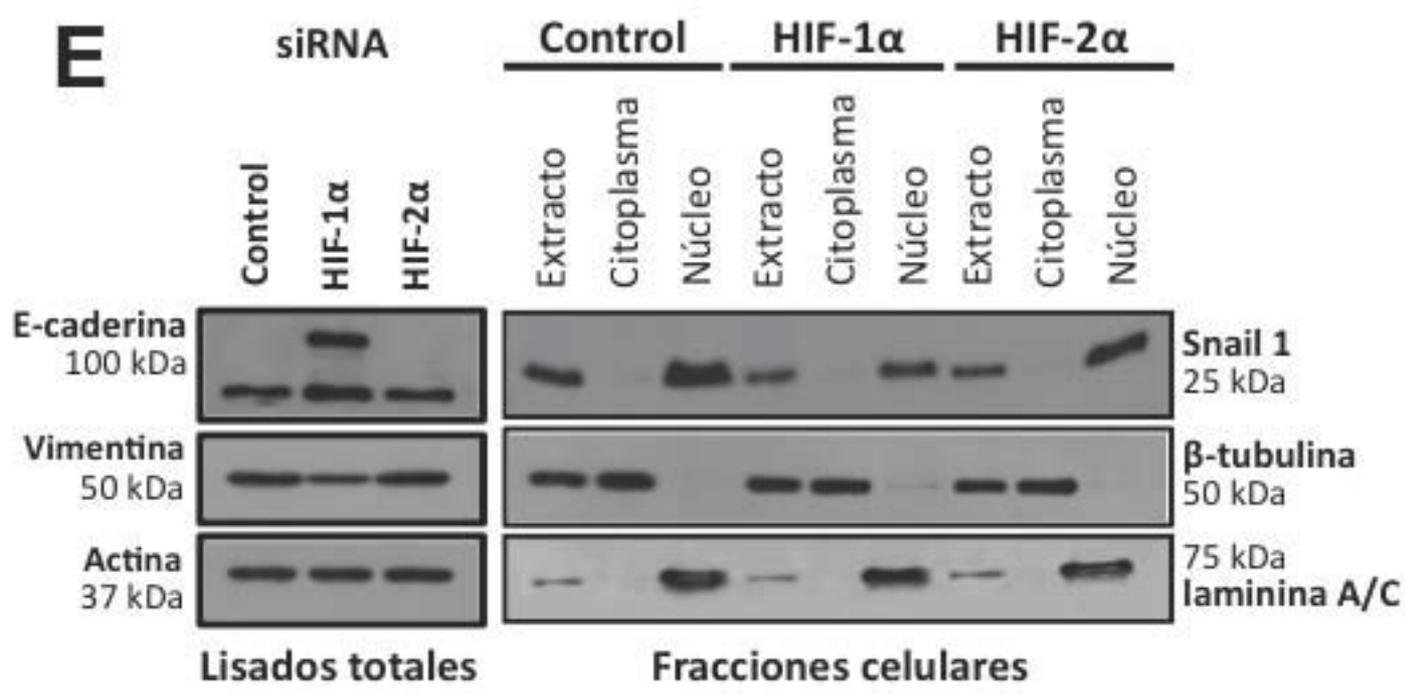
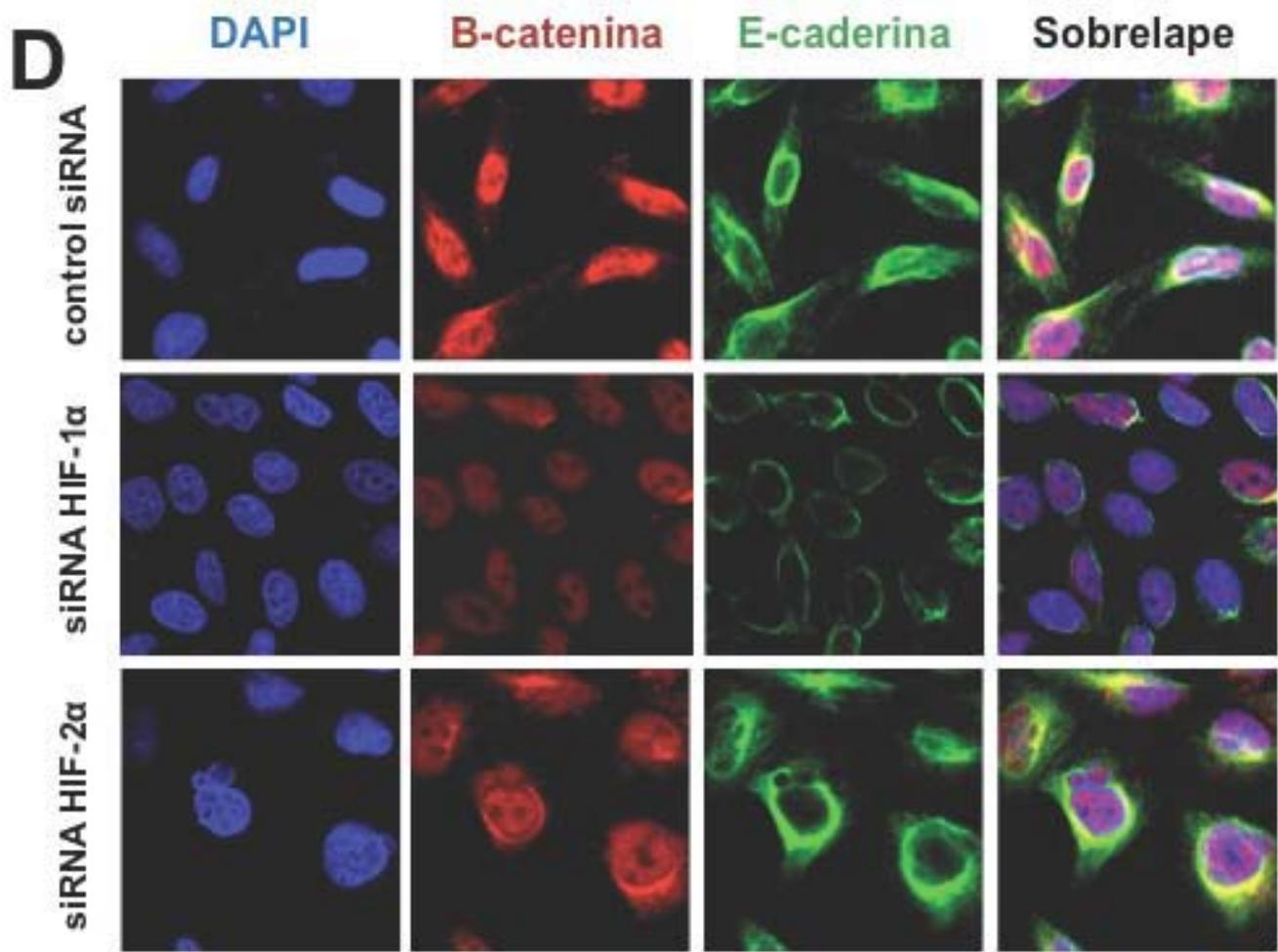


Figura 15. El silenciamiento de HIF-1 α en las células SW480 disminuye los niveles de expresión de β -catenina e induce su colocalización con E-caderina en la membrana plasmática. A) *Panel superior.* Análisis de la expresión de β -catenina en células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α . Las células fueron teñidas intracelularmente como se indica en materiales y métodos. Los niveles de fluorescencia fueron analizados por citometría de flujo. Como controles fueron teñidas células con solo anticuerpo secundario y usadas para definir los niveles basales de fluorescencia (datos no se muestran). La figura muestra la sobreposición de los histogramas obtenidos para las células SW480 control (trazo azul), células silenciadas para HIF-1 α (trazo verde) y células silenciadas para HIF-2 α (trazo naranja). La gráfica de barras lateral muestra la media de la intensidad media de fluorescencia \pm SEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado * $p < 0.05$. *Panel intermedio.* Cuantificación de los niveles de expresión de β -catenina en núcleos aislados de células SW480 control y silenciadas para la expresión de HIF-1 α . *Panel inferior.* Cuantificación de los niveles de expresión de β -catenina en núcleos aislados de células SW480 control y silenciadas para la expresión de HIF-2 α . Los núcleos fueron purificados y teñidos como se describe en materiales y métodos. Previo al análisis de las muestras se generaron cuadrantes independientes para ubicar el tamaño y granularidad de células intactas y de núcleos aislados teñidos con PI de manera que sirvieran como referencia para ubicar a las poblaciones de núcleos. Las figuras muestran el solapamiento de los histogramas para los núcleos aislados a partir de células SW480 control (trazo azul), de células deficientes para la expresión de HIF-1 α (trazo verde) y de células deficientes para la expresión de HIF-2 α (trazo naranja). Se muestra un histograma representativo de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Los datos presentados en el gráfico representan la media de la intensidad de la fluorescencia \pm SEM de tres experimentos independientes * $p < 0.05$ * $p < 0.001$ **B)** Análisis de la localización intracelular de β -catenina y E-caderina mediante microscopía confocal. Células SW480 control o silenciadas establemente para la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α fueron sembradas en cubreobjetos y tras alcanzar confluencia fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas para determinar la localización de β -catenina y E-caderina (microfotografías panel B) o para Snail 1 y vimentina (micrografías panel D). La tinción nuclear se obtuvo incubando las muestras con 4'6-diamino-2-fenilindol (DAPI). La fluorescencia fue analizada por microscopía confocal como se describe en materiales y métodos. E-caderina y vimentina fueron visualizadas utilizando un anticuerpo secundario acoplado a Cy3, mientras que β -catenina y Snail 1 fueron visualizadas usando un anticuerpo secundario acoplado a Alexa 647. Como control de unión inespecífica y con la finalidad de eliminar la fluorescencia basal, las células fueron teñidas usando sólo anticuerpo secundario y analizadas. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. Escala 10 μ m. **C)** Microfotografías de células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α . Células SW480 fueron cultivadas a subconfluencia y fotografiadas para mostrar los cambios morfológicos asociados al silenciamiento estable de los factores transcripcionales HIF-1 α o HIF-2 α . **D)** Análisis de la localización intracelular de Snail 1 y Vimentina mediante microscopía confocal. **E)** Análisis de la expresión de los marcadores relacionados al programa EMT por western blot. *Panel izquierdo.* Análisis por western blot de los niveles de expresión de E-caderina y Vimentina en lisados totales obtenidos a partir células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α . Los niveles de expresión de actina fueron analizados como control de carga. *Panel derecho.* Análisis por western blot de los niveles de expresión de Snail 1 en fracciones citoplásmicas o nucleares obtenidas a partir células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α . β -tubulina y laminina A/C fueron usados como marcadores de la fracción citoplasmática o nuclear respectivamente para confirmar la pureza de cada fracción. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.**

silenciamiento de HIF-2 α y como se observa en la figura 15C cambia su distribución y se localiza en la región perinuclear, característica asociada a un fenotipo más agresivo [88]. Estos resultados son consistentes con reportes previos donde se demuestra que HIF-1 α activa la vía canónica para promover el programa EMT en las células cancerosas [66, 89] y también se demuestra que el silenciamiento de HIF-2 α induce un incremento en la vía de señalización Wnt canónica incrementando la cantidad del coactivador transcripcional β -catenina en el núcleo, particularmente bajo condiciones de hipoxia, sugiriendo que esta proteína puede modular negativamente la vía Wnt.

La expresión de los marcadores asociados al fenotipo troncal, CD44 y Oct4 o al fenotipo diferenciado, CD24 y CK-20, cambia como consecuencia del silenciamiento de los factores HIF α . Nuestros resultados muestran que la actividad de β -catenina en respuesta al silenciamiento de los factores HIF α está desregulada y genera cambios tanto en su actividad transcripcional como en el programa EMT, por lo que decidimos analizar los niveles de expresión de distintas proteínas cuya regulación estuviera implicada en la vía Wnt, HIF α , el programa EMT o de diferenciación. Mediante citometría de flujo analizamos el efecto del silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α sobre la expresión de distintos marcadores de superficie: CD44, glicoproteína cuya expresión se asocia al fenotipo troncal [15]; Oct4, factor transcripcional asociado al fenotipo troncal embrionario [90]; CD24, una sialoglicoproteína cuya expresión se asocia al fenotipo secretor [91] y CK20, proteína de filamentos intermedios del citoesqueleto cuya expresión se asocia al fenotipo epitelial [8]. Estos marcadores fueron escogidos no sólo por su asociación a fenotipos específicos sino porque esos fenotipos están asociados a programas genéticos regulados a distintos niveles. De tal manera, la expresión de CD44 forma parte del programa genético controlado por β -catenina/TCF-4 y su expresión está asociada a la desregulación de la vía de señalización Wnt, como uno de los primeros eventos en la secuencia adenoma-carcinoma en el colon [92]; mientras que la expresión de Oct4 es un sello característico del fenotipo troncal embrionario en tumores agresivos y se asocia a la activación del factor HIF-2 α [90]. Por otra parte, el marcador CD24 está regulada por el factor Twist y su expresión se asocia a las células de fenotipo secretor que constituyen el nicho de las células troncales en la cripta [91, 93]; y la expresión de CK20 está regulada

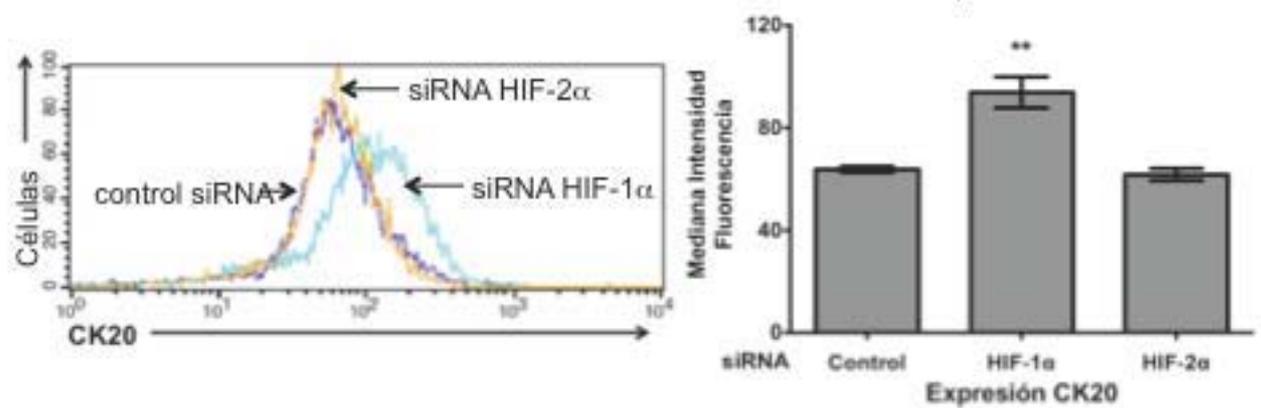
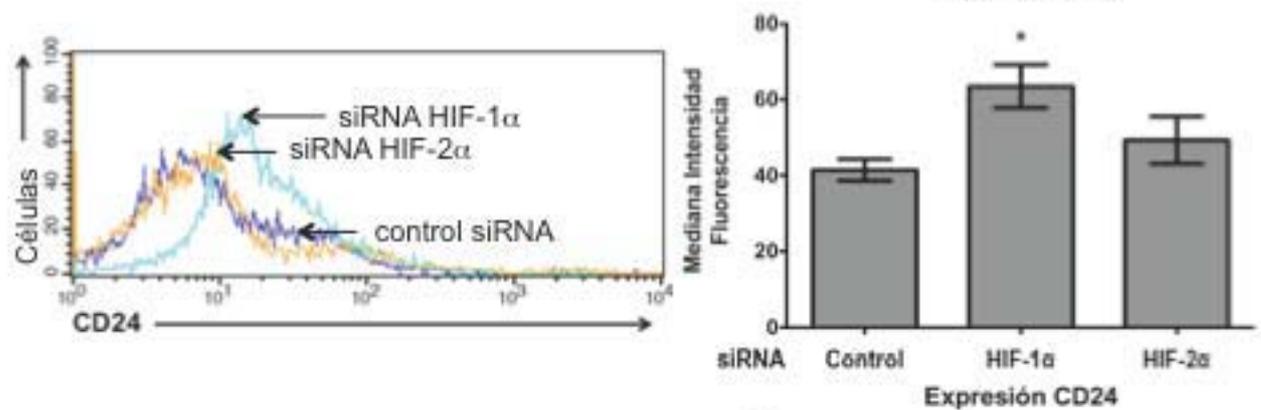
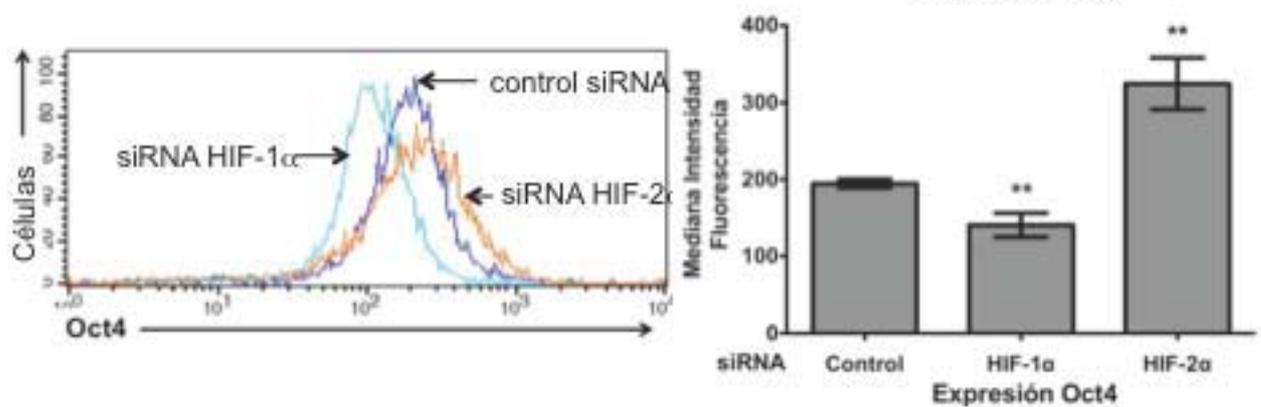
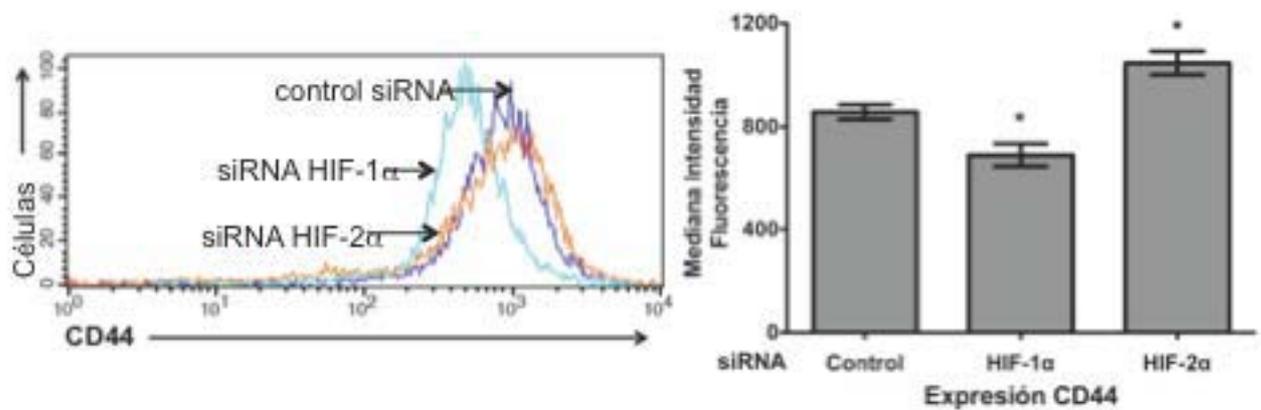


Figura 16. El silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α tienen efectos opuestos en la expresión de los marcadores asociados al fenotipo troncal CD44 y Oct4, pero solamente el silenciamiento de HIF-1 α incrementa la expresión del marcador de diferenciación CK20. Análisis de los niveles de expresión de los marcadores CD44, Oct4, CD14 y CK20 en las células SW480 control o silenciadas para HIF-1 α o HIF-2 α mediante citometría de flujo. Las células se tiñeron extracelularmente para CD44 y CD24, e intracelularmente para Oct4 y CK20 para realizar análisis de citometría de flujo como se indica en materiales y métodos. Cada panel muestra la sobreposición de los histogramas obtenidos tras el análisis de las células SW480 control (trazo azul), las células silenciadas establemente para HIF-1 α (trazo verde) para HIF-2 α (trazo naranja). Los resultados se muestran en histogramas representativos de cuatro experimentos realizados independientemente. Las gráficas de barras representan la media de la mediana de la intensidad de fluorescencia \pm SEM de cuatro experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

por el factor transcripcional CDX1, que es activado específicamente durante el desarrollo y la diferenciación gastrointestinal y cuya expresión está regulada por el factor LEF-1, otro conocido compañero de β -catenina [94]. Los resultados muestran que la depleción de HIF-1 α disminuye los niveles de expresión de CD44 y Oct4 e incrementa los de CD24 y CK20 con respecto a las células control (figura 16). En contraste, el silenciamiento de HIF-2 α no afecta la expresión de CD24 ni CK20, pero induce el incremento de los marcadores asociados al fenotipo troncal CD44 y Oct4. Todos estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que HIF-1 α participa en la inducción del programa EMT que permite a las células cancerosas adquirir características mesenquimales. Esto da evidencia de que HIF-1 α e HIF-2 α juegan papeles complementarios más no redundantes en la biología del cáncer de colon pues no activan las mismas vías involucradas en el mantenimiento del fenotipo troncal o la diferenciación.

DISCUSIÓN

Los factores transcripcionales HIF juegan un papel crucial en muchos aspectos de la biología del cáncer incluyendo angiogénesis, mantenimiento del fenotipo troncal, reprogramación metabólica, señalización autócrina de factores de crecimiento, programa EMT, invasión y metástasis [19, 95]. El incremento en la expresión de HIF-1 α e HIF-2 α se ha descrito en una amplia variedad de cánceres humanos y se asocia a un mal pronóstico. Aún en ausencia de hipoxia se han detectado altos niveles de expresión, pues la señalización oncogénica sostenida induce la expresión de los factores HIF α por mecanismos independientes de oxígeno como el incremento en la transcripción o traducción de HIF-1 α [96]. Al respecto, nosotros mostramos que sólo las células de carcinoma coexpresan HIF-1 α e HIF-2 α en normoxia en contraste con los niveles de expresión detectados en células de colon no malignas.

En este estudio analizamos la participación de HIF-1 α e HIF-2 α en el mantenimiento del fenotipo maligno y en la actividad transcripcional mediada por β -catenina. Para ello usamos dos líneas celulares de cáncer de colon que representan dos contextos genéticos Wnt diferentes: la línea RKO que expresa a la proteína APC normal y cuya vía Wnt canónica depende de la presencia de ligando Wnt para su activación, y la línea SW480, que expresa una mutante trunca de APC y representa a las células de cáncer de colon que presentan la vía Wnt constitutivamente activa [72]. El silenciamiento estable de HIF-1 α o HIF-2 α fue inducido mediante siRNA y se evaluaron los efectos que la depleción de estas proteínas tenían sobre la señalización Wnt/ β -catenina, el mantenimiento del fenotipo troncal y en la expresión de los marcadores asociados al fenotipo troncal y diferenciado. Aunque el silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α negativamente afecta la resistencia a apoptosis, el metabolismo tumoral, la capacidad de migración y la actividad tumorigénica en líneas celulares de cáncer de colon, la deficiencia en la expresión de estas proteínas tiene efectos específicos asociados a la pérdida de cada isoforma, reforzando el concepto de que las isoformas HIF α pueden actuar independientemente y que su expresión no es redundante en la regulación de distintos procesos biológicos asociados al fenotipo canceroso [97]. Al respecto, nuestros datos concuerdan con lo ya reportado por Imamura *et al.* en

lo que respecta al cáncer de colon. Estos investigadores también demostraron funciones celulares divergentes para las isoformas HIF α en la línea celular de cáncer de colon SW480; en su análisis se muestra que el silenciamiento específico de la isoforma HIF-1 α provoca la disminución de la capacidad proliferativa y migratoria *in vitro*, mientras que el silenciamiento de HIF-2 α no afecta la capacidad proliferativa *in vitro* pero induce un incremento en la formación de colonias en ensayos de agar suave [71].

Con respecto a los efectos negativos observados en apoptosis, producción de lactato y migración como consecuencia de silenciamiento de HIF-1 α o HIF-2 α , la deficiencia en la expresión de HIF-1 α ocasiona efectos mucho más drásticos que aquellos observados en las células deficientes para HIF-2 α . Este fenómeno podría encontrar una explicación en los datos reportados previamente en donde se muestra que aún y cuando ambos factores tienen blancos transcripcionales comunes, como VEGF, cada isoforma HIF α tiene blancos únicos. En consecuencia, el efecto del silenciamiento de la isoforma implicada será más evidente en esa vía. En análisis usando técnicas de inmunoprecipitación de cromatina de alta resolución se mostró la preferencia que muestran tanto HIF-1 α como HIF-2 α por genes específicos [95]. Por ejemplo, HIF-1 α se une preferentemente a genes de la vía glucolítica, mientras que HIF-2 α se une a genes como metaloproteínas, cuya expresión se asocia a la capacidad invasiva [98-99], y el factor transcripcional asociado al fenotipo troncal Oct-3/4 [63]. En concordancia con estos reportes, y algunos previos en donde se muestra que HIF-1 α juega un papel importante en la glucólisis, autofagia y apoptosis, nuestros datos muestran que la secreción de lactato bajo condiciones de normoxia disminuye en un 50% como resultado del silenciamiento de HIF-1 α , mientras que sólo disminuye en un 20% cuando es silenciada la expresión de HIF-2 α . Un fenómeno similar se observó al analizar la resistencia a apoptosis en las células SW480: se detectó una mayor proporción de apoptosis tras el silenciamiento de HIF-1 α que con el de HIF-2 α con respecto al control y esta diferencia fue mucho más evidente cuando las células fueron sujetas a estrés oxidativo. Sin embargo, a diferencia del incremento observado en los niveles de apoptosis tras el silenciamiento de HIF-1 α no se observa la misma respuesta en

el caso de HIF-2 α , lo que implicaría que tras el silenciamiento de HIF-2 α adquirieron la capacidad de responder a estrés oxidativo. Este fenómeno podría asociarse al aumento en la actividad de la isoforma HIF-1 α tras el incremento en su capacidad de transactivación inducido por la fosforilación mediada por ERK1/2, en respuesta a la activación de la vía Ras, como se ha reportado ocurre en respuesta a estrés oxidativo [100]. Con respecto al efecto observado tras el silenciamiento de las isoformas HIF α sobre la capacidad de migración celular, aún cuando el silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α causa la inhibición de la motilidad celular *in vitro*, los mecanismos moleculares implicados para cada isoforma parecen ser distintos, dado que sólo el silenciamiento de HIF-1 α disminuye la expresión del receptor CXCR4. Consistente con esta hipótesis se ha reportado que la inducción en la expresión del receptor CXCR4 como respuesta a hipoxia depende de la activación de HIF-1 α en células cancerosas y se traduce en el incremento en la respuesta quimiotáctica a su ligando específico, SDF-1 [101]. En el caso del silenciamiento de HIF-2 α , el mecanismo podría estar asociado a la desregulación en la expresión de HIF-1 α , pues como consecuencia del silenciamiento de HIF-2 α hay un incremento en la expresión de HIF-1 α (los datos no se muestran). Esto podría explicar la disminución en la capacidad de cierre de herida y respuesta quimiotáctica observada tras el silenciamiento de HIF-2 α si se toman en cuenta los reportes en donde se ha demostrado que la inducción o represión de la migración celular depende de niveles específicos de expresión de HIF-1 α . Este fenómeno se asocia a la regulación de la expresión de perfiles genéticos que le permiten a un grupo de células migrando responder e interactuar con substratos adyacentes, evidencia aportada por estudios realizados en el conjunto de células localizadas en el borde de migración del ovario de *Drosophila melanogaster*, modelo usado para estudiar la respuesta a hipoxia en el ambiente tumoral [102].

La actividad tumorigénica de las subpoblaciones CD44-/CD133- y CD44+/CD133- aisladas a partir de las células SW480 control o aquellas en donde fue silenciada la expresión de HIF-1 α o HIF-2 α y de las células SW620, cuyo fenotipo es metastático, disminuyó drásticamente. Los resultados muestran que la actividad tumoral disminuye como resultado del silenciamiento tanto de HIF-1 α como de

HIF-2 α enfatizando la importancia de ambos factores en la promoción del crecimiento tumoral *in vivo*, como ya se ha reportado. Sin embargo, el silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α regulan de manera opuesta la vía de señalización Wnt canónica y producen efectos opuestos en la expresión de marcadores asociados al fenotipo troncal o diferenciado. Aunque estudios previos involucran a los factores HIF α en la regulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, los mecanismos moleculares de comunicación no son aún claros. Nosotros encontramos que el silenciamiento de HIF-1 α disminuye la actividad transcripcional mediada por β -catenina, mientras que el silenciamiento de HIF-2 α la incrementa, particularmente bajo condiciones de hipoxia. Observamos que este fenómeno podría deberse a que tras el silenciamiento de HIF-1 α no sólo disminuyen los niveles totales de β -catenina en la célula y en núcleo, sino que además se induce su translocación a la membrana plasmática en donde colocaliza con la proteína E-caderina. Todo esto tiene como consecuencia el que disminuya la actividad transcripcional mediada por β -catenina. Parece fácil encontrar una explicación a este fenómeno si asociamos la disminución en la actividad transcripcional a la disminución en la expresión de β -catenina, pero hay varios puntos que se deben considerar. Uno de ellos es tratar de entender mediante qué mecanismos disminuye la cantidad total de β -catenina en las células SW480, que carecen de un complejo de degradación funcional, en respuesta al silenciamiento del factor HIF-1 α y dada la importancia de β -catenina en la homeostasis del epitelio del colon cabe preguntarse si la disminución en la expresión se debe a una disminución en la transcripción de la proteína, que se sabe se expresa constitutivamente, o bien encuentra explicación en algún mecanismo de degradación paralelo. Esta posibilidad no parece tan remota tras el trabajo de Choi J *et al.* que muestra a la proteína FIP200, proteína de andamiaje que se asocia a proteínas de la familia de cinasas de adhesión focal, como un inductor de la degradación de β -catenina de manera independiente a APC pero dependiente de la ligasa de ubiquitina E3, β -TrCP [103].

En contraste, el silenciamiento de HIF-2 α induce un incremento en la actividad transcripcional de β -catenina, en la ya robusta actividad presente en las células SW480, como consecuencia de la acumulación de β -catenina en el núcleo. Si

culpamos directamente a HIF-2 α , esto sugiere que regula negativamente la vía de señalización Wnt canónica y el mecanismo, aún cuando desconocido, involucra una vía que regula la cantidad de β -catenina en el núcleo y mecanismos inhibitorios que se exacerban durante la respuesta a hipoxia. Cabe resaltar la relevancia de HIF-2 α como un regulador del fenotipo canceroso y mencionar el trabajo de Franovic *et al.* quién demostró que en procesos malignos genéticamente diversos existe un punto de convergencia que involucra a HIF-2 α . Estos investigadores demostraron que la inhibición de HIF-2 α previene el crecimiento y la tumorigénesis *in vivo* en glioblastoma, cáncer colorectal, cáncer de células no pequeñas de pulmón y la proliferación autónoma *in vitro* de diversos tipos de cáncer sin importar su fondo genético o el tejido de origen [104].

Durante la progresión del cáncer y la adquisición de la capacidad metastásica en las células cancerosas se establece el programa EMT, que les permite adquirir características mesenquimales, lo que favorece su capacidad para invadir otros tejidos. La invasión involucra cambios en adhesión y motilidad así como en la capacidad para remodelar matriz extracelular [65-66, 89]. Tanto HIF-1 α como la vía de señalización Wnt canónica induce el programa EMT en células cancerosas. Cannito *et al.* [65] dieron evidencia de cambios asociados a un ambiente hipóxico generan un mecanismo bifásico que involucra, en una etapa temprana y dependiente de la producción de especies reactivas de oxígeno, la inhibición de GSK-3 β seguida de la translocación a núcleo de Snail 1 y de β -catenina.

Estudiando el carcinoma hepatocelular, se demostró que el programa EMT inducido por hipoxia puede recuperarse, aún estando reprimido mediante el uso del siRNA para β -catenina, tras la estimulación de la vía Wnt canónica usando el ligando Wnt3a [66]. Por otra parte, Zhao *et al.* [89] describieron que la inhibición de la vía de señalización Wnt, mediante shRNA de β -catenina, revierte el programa EMT inducido por HIF-1 α en el cáncer de próstata humano. En correspondencia con estos reportes nosotros observamos que el silenciamiento de HIF-1 α e HIF-2 α desregula la actividad transcripcional mediada por β -catenina y eso tiene consecuencias en los marcadores asociados al establecimiento del programa EMT. Tras el silenciamiento de HIF-1 α , disminuye la expresión de los marcadores asociados al fenotipo troncal, CD44 y Oct4, comparados con las

células control. Observamos que revierte el programa EMT incrementando la expresión de E-caderina, y su forma funcional de 120 KDa, y del marcador epitelial CK20 e induce la disminución de la expresión de vimentina y Snail 1 nuclear. Además, el silenciamiento de HIF-1 α , se asocia con una disminución en la expresión de β -catenina y su colocalización en la membrana plasmática, con E-caderina. Mecanismo que actuaría previniendo su localización nuclear y transactivación. En contraste, el silenciamiento de HIF-2 α tiene consecuencias opuestas en lo que se refiere a la expresión de los marcadores asociados al fenotipo troncal y diferenciado, así como consecuencias drásticas en la localización y actividad de β -catenina. Al respecto cabe mencionar, por la semejanza del fenotipo generado, las consecuencias del silenciamiento de BCL9-2 sobre la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Al igual que nuestros resultados, el silenciamiento de BCL9-2 induce el fenotipo epitelial en células de carcinoma y la translocación del núcleo a la membrana plasmática de β -catenina. En este reporte también se menciona que el cambio entre la β -catenina asociada a las estructuras de adhesión y la β -catenina asociada a las funciones transcripcionales es modulado por la fosforilación en el residuo de tirosina 142 que impide su interacción con BCL9-2 [105]. Este fenómeno hasta ahora no se ha relacionado con la actividad de ninguno de los factores HIF α . Sin embargo, hay evidencias de que BCL9-2 juega un papel específico en el colon y el establecimiento del programa EMT. En ratones *vil-Cre-Bcl9^{-/-}/Bcl9-2^{-/-}* la vía de señalización Wnt canónica no presenta alteraciones significativas en el epitelio del intestino delgado y disminuye ligeramente en el epitelio del colon. Solo se observó una disminución importante al analizar la expresión de genes asociados a fenotipos específicos: T braquiuria y vimentina, marcadores del fenotipo mesenquimal; Lgr5, asociado al fenotipo troncal; y el gen Prox1, asociado a lo progresión del cancer en el colon. Además se observó la regulación negativa de genes involucrados en el programa EMT como: Foxc2, que promueve la diferenciación mesenquimal; Hmga2, que regula la expresión de Snail 1; y Snail 2, Twist1, Zeb1/2, otros factores transcripcionales EMT [106]. Lo anterior indica que BCL9-2 participa directamente sobre la regulación de genes que controlan el programa EMT y el fenotipo troncal y no así en las señales generadas por la vía Wnt involucradas en la proliferación; hipótesis que ajusta a nuestras observaciones y se asocia al estableimiento del

programa EMT. Se sabe que las células SW480 sobreexpresan BCL9-2 [105], por lo que predecir la asociación entre ella y β -catenina como una explicación a la acumulación de β -catenina en el núcleo y el incremento en la actividad transcripcional asociada al silenciamiento de HIF-2 α no parece una remota posibilidad. Aunque aún quedaría por contestar qué induce su asociación y translocación y si la fosforilación en el residuo de tirosina 142 también está implicado en este fenómeno.

En una patología tan compleja como el cáncer es importante establecer las consecuencias de la regulación integral de los factores HIF α sobre las funciones celulares. Su complejidad no se remite a la regulación de la expresión génica, pues son capaces de modular diversas vías de señalización interactuando directamente con múltiples componentes clave como ocurre con p53 [107], c-Myc [51, 70], y β -catenina [79]. Las consecuencias de esta comunicación son múltiples y pueden convergir en distintos puntos como ocurre en la expresión de CD44 y la activación de la apoptosis. Al respecto, algunos reportes sugieren que la expresión de CD44 no es necesaria para el mantenimiento de la proliferación (neoplásica) en el epitelio intestinal, pero está involucrada en regular la tasa apoptótica en el borde de la zona de amplificación-tránsito en la cripta, fenómeno ya observado y conocido como muerte apoptótica altruista dado que es favorecida sobre la activación de los mecanismos de reparación del DNA [108]. Al respecto, nuestros datos muestran que hay un cambio importante en la expresión de CD44 y aún cuando HIF α /Myc no están involucrados en regular su transcripción si lo están en regular la respuesta apoptótica. Por lo que al observar cambios tan drásticos en la activación de la apoptosis/expresión de CD44 sería interesante analizar si la actividad de HIF1- α representa el punto de convergencia en la decisión entre la vía del programa de muerte altruista vs. reparación DNA.

El mecanismo más interesante que denota el antagonismo entre ambas subunidades involucra la modulación de la actividad transcripcional de c-Myc. Mientras que HIF-1 α inhibe la actividad transcripcional de c-Myc, al impedir su unión al DNA compitiendo por Max, HIF-2 α regula a c-Myc favoreciendo su interacción con Sp1, Miz y Max. En el caso de β -catenina, al igual que su interferencia en la formación del complejo c-Myc/Max, HIF-1 α impide su

interacción con TCF-4 [79]. En cambio, HIF-2 α se opone a los efectos de HIF-1 α sobre la interacción TCF/ β -catenina y actúa como un coactivador en el complejo TCF/ β -catenina [109]. Nuestros resultados, del mismo modo, revelan la complejidad en la comunicación entre la actividad de los factores HIF α y la vía de señalización Wnt canónica en células de cáncer de colon. Mostramos que HIF-1 α e HIF-2 α tienen efectos contrarios con consecuencias inesperadas sobre la regulación de la vía Wnt/ β -catenina. De los dos factores, los mayores niveles de expresión los tiene HIF-1 α , y es reconocido como el principal mecanismo activado en respuesta a estrés oxidativo e hipoxia, datos que concuerdan con nuestros hallazgos. El trabajo de Kaidi A, [et al.] demostró, en células SW480 bajo condiciones de hipoxia, que HIF-1 α inhibe la formación del complejo β -catenina/TCF-4 secuestrando a β -catenina para transcribir genes blanco HIF-1 α , favoreciendo la supervivencia sobre la proliferación [79]. Nosotros observamos, en células SW480 bajo condiciones de normoxia, que el silenciamiento de HIF-1 α incrementa la apoptosis en condiciones basales apoyando la hipótesis de que HIF-1 α está comprometida en establecer mecanismos de supervivencia celular. Si ese es el rol de HIF-1 α y está comprometida en regular la supervivencia celular, diversos mecanismos fueron activados cuando en las mismas células y bajo las mismas condiciones silenciamos a HIF-2 α . En este caso, como consecuencia al silenciamiento, observamos un incremento en la actividad transcripcional mediada por β -catenina/TCF-4; fenómeno que no esperábamos tomando en cuenta los reportes donde se describe a HIF-2 α como una proteína capaz de asociarse y activar el complejo β -catenina/TCF favoreciendo la proliferación de células cancerosas de riñón; debería haber disminuido. ¿Cómo explicarlo? Nosotros no observamos una disminución en la actividad transcripcional mediada por β -catenina/TCF, pero sí observamos que sin HIF-2 α incrementa la expresión y actividad transcripcional de c-Myc (no se muestran los datos) y los niveles de expresión de Oct4. Ambos factores se usan para inducir el estado pluripotente [110], por lo que podríamos plantear que el estado de las células SW480 donde HIF-2 α fue silenciada asemeja al estado de las células embrionarias y bajo tales condiciones se ha visto que HIF-1 α puede regular positivamente la vía de señalización β -catenina/TCF-4. Si esto se ajusta a la realidad, predecimos que al

análizar el programa genético establecido tras el silenciamiento de HIF-1 α se observaría el “encendido” de la vía apoptótica. En el caso de HIF-2 α observaríamos el establecimiento del programa troncal, la regulación positiva de HIF-1 α sobre β -catenina y el incremento en la expresión de los factores transcripcionales LEF y TCF-4.

Para concluir, es de suma importancia esclarecer el rol de cada uno de los participantes para entender de qué manera se establece un equilibrio entre la expresión y actividad de cada factor transcripcional, en especial cuando se coexpresan y se están usando inhibidores para la función de estos factores en ensayos clínicos. Nuestros resultados demuestran que la capacidad tumoral de las células de cáncer de colon depende tanto de la actividad de HIF-1 α como de HIF-2 α . Aún y cuando sus efectos sobre la vía de señalización Wnt sean opuestos, entre ellos se establece un equilibrio que regula tanto la expresión como la actividad transcripcional de β -catenina.

CONCLUSIONES GENERALES

Nuestros resultados muestran que aún cuando las funciones de HIF-1 α y HIF-2 α son esenciales para el mantenimiento del fenotipo troncal y el maligno cada proteína participa de diferente manera y juega roles opuestos en la vía de señalización Wnt canónica.

PUBLICACIONES

El trabajo realizado durante mis estudios doctorales y la colaboración con distintos proyectos durante mi estancia en el laboratorio de señalización bajo la dirección de la Dra. Martha Robles Flores generó las siguientes publicaciones:

Carmen Figueroa-Aldariz M, Castañeda-Patlán MC, **Santoyo-Ramos P**, Zentella A, Robles-Flores M. (2014) Protein phosphatase 2A is essential to maintain active Wnt signaling and its A β tumor suppressor subunit is not expressed in colon cancer cells. *Mol Carcinog*. 2014 doi: 10.1002/mc.22217

MOLECULAR CARCINOGENESIS

Protein Phosphatase 2A Is Essential to Maintain Active Wnt Signaling and its A β Tumor Suppressor Subunit Is not Expressed in Colon Cancer Cells

M. Carmen Figueroa-Aldariz,¹ M. Cristina Castañeda-Patlán,¹ Paula Santoyo-Ramos,¹ Alejandro Zentella,² and Martha Robles-Flores^{1*}

¹*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico D.F., Mexico*

²*Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico D.F., Mexico*

Hernández-Maqueda JG, Luna-Ulloa LB, **Santoyo-Ramos P**, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. (2013) Protein kinase C delta negatively modulates canonical Wnt pathway and cell proliferation in colon tumor cell lines. *PLoS One*. 8(3):e58540

 PLOS ONE

Protein Kinase C Delta Negatively Modulates Canonical Wnt Pathway and Cell Proliferation in Colon Tumor Cell Lines

José G. Hernández-Maqueda, Luis Bernardo Luna-Ulloa, Paula Santoyo-Ramos, M. Cristina Castañeda-Patlán, Martha Robles-Flores*

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Luna-Ulloa LB, Hernández-Maqueda JG, **Santoyo-Ramos P**, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. (2011). Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis*. 32(11):1615-24.

Carcinogenesis vol.32 no.11 pp.1615-1624, 2011
doi:10.1093/carcin/bgr190
Advance Access publication August 22, 2011

Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines

Luis Bernardo Luna-Ulloa, José G.Hernández-Maqueda, Paula Santoyo-Ramos, M.Cristina Castañeda-Patlán and Martha Robles-Flores*

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 3000, México, 04510, México



Hypoxia-Inducible Factors Modulate the Stemness and Malignancy of Colon Cancer Cells by Playing Opposite Roles in Canonical Wnt Signaling

Paula Santoyo-Ramos, María Likhatcheva, Eduardo A. García-Zepeda, M. Cristina Castañeda-Patlán, Martha Robles-Flores*

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, and Biomedical Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico

Abstract

This study examined the role played by hypoxia-inducible factors (HIFs) in malignant phenotype maintenance and canonical Wnt signaling. Under normoxia, we determined that both HIF-1 α and HIF-2 α are expressed in human colon cancer cells but not in their non-malignant counterparts. The stable knockdown of HIF-1 α or HIF-2 α expression induced negative effects on the malignant phenotype of colon cancer cells, with lactate production, the rate of apoptosis, migration, CXCR4-mediated chemotaxis, and tumorigenic activity all being significantly affected by HIF knockdown and with HIF-1 α depletion exerting greater effects. Knockdown of these two HIF transcripts induced different and even opposite effects on β -catenin transcriptional activity in colon cancer cells with different genetic Wnt signaling pathways. In SW480 cells, HIF-2 α knockdown did not affect β -catenin levels, increasing the transcriptional activity of β -catenin by inducing its nuclear accumulation, whereas HIF-1 α silencing negatively affected the stability and transcriptional activity of β -catenin, inducing its exit from the nuclei and its recruitment to the cell membrane by E-cadherin. In addition, although HIF-1 α depletion induced a reversal of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), HIF-2 α silencing altered the expression of the stem cell markers CD44, Oct4, and CD24 and of the differentiation marker CK20 in the opposite direction as HIF-1 α silencing. Remarkably, HIF-2 α knockdown also enhanced β -catenin transcriptional activity under hypoxia in cells that displayed normal Wnt signaling, suggesting that the gene negatively modulates canonical Wnt signaling in colon cancer cells. Taken together, our results indicate that HIFs play opposing roles in canonical Wnt signaling and are essential for the stemness and malignancy maintenance of colon cancer cells.

Citation: Santoyo-Ramos P, Likhatcheva M, García-Zepeda EA, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M (2014) Hypoxia-Inducible Factors Modulate the Stemness and Malignancy of Colon Cancer Cells by Playing Opposite Roles in Canonical Wnt Signaling. PLoS ONE 9(11): e112580. doi:10.1371/journal.pone.0112580

Editor: Gregory M. Kelly, Western University, Canada

Received: July 2, 2014; **Accepted:** October 8, 2014; **Published:** November 14, 2014

Copyright: © 2014 Santoyo-Ramos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that, for approved reasons, some access restrictions apply to the data underlying the findings. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by grants from Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM IN226111 and IN215514) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT CB2011-151731). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: rmartha@unam.mx

Introduction

Wnt signaling has been well-characterized as one of the most important contributors to tumorigenesis in many types of solid tumors. Aberrant canonical Wnt signaling is known to contribute to early progression in the majority of colorectal cancers. Indeed, a great amount of experimental evidence has shown that mutations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene act as gatekeepers in the molecular pathogenesis of the majority of sporadic and hereditary forms of colorectal carcinoma [1,2]. The Wnt pathway has also been demonstrated to play an important role in the development and regulation of adult stem cell systems, and canonical Wnt signaling supports the formation and maintenance of both stem and cancer stem cells (CSC) [3].

Canonical Wnt signaling operates through the regulation of the phosphorylation and degradation of the transcription co-activator β -catenin. Without stimulation by Wnt, β -catenin is assembled into the so-called destruction complex, in which APC plays a central role, and this complex also includes axin, GSK-3 β and

Casein kinase 1. This complex directs a series of phosphorylation events in β -catenin that make it a target for ubiquitination and subsequent proteolysis via the proteasome [4]. Stimulation by Wnt leads to the inhibition of β -catenin breakdown, allowing β -catenin to accumulate, enter the nucleus, and activate Wnt target genes such as *CYCLIN D1* and *C-MYC* proto-oncogenes, which promote the entry of the cell into the S phase of the cell cycle [5].

Tumor hypoxia and the critical mediators of the cellular oxygen signaling pathway, namely the hypoxia-inducible factors (HIFs), are known to regulate multiple steps of tumorigenesis and are typically associated with changes in metabolism, neo-vascularization, invasion, metastasis, drug resistance, and ultimately poor clinical outcomes [6]. HIFs are heterodimeric transcription factors consisting of HIF- α and HIF- β (or ARNT) that are expressed constitutively at the transcriptional and translational levels. HIF-1 α and HIF-2 α (also known as EPAS1) are the two best-studied members of the HIF- α family. Under normoxic conditions, the HIF- α subunits are hydroxylated at key proline residues, which

allows them to be recognized by the von Hippel-Lindau (pVHL) tumor suppressor, the substrate recognition component of an E3 ubiquitin ligase complex that targets HIF- α for proteasomal degradation. Hypoxic signaling stabilizes HIF- α by inhibiting prolyl hydroxylation, and in turn ubiquitin proteasomal degradation, making HIF- α capable of dimerizing with ARNT, binding to the hypoxia-responsive DNA element, and recruiting the transcription coactivator p300/CBP for the transcriptional activation of a host of hypoxia-responsive genes [7].

Given the structural similarities of HIF-1 α and HIF-2 α , they were thought to act redundantly in the cellular response to hypoxia. However, a growing body of evidence indicates that HIF-1 α and HIF-2 α induce the expression of different sets of genes. Although HIF-1 α and HIF-2 α have shared targets such as vascular endothelial growth factor (VEGF), they also regulate unique gene targets; HIF-1 α regulates glycolytic enzymes [8] and HIF-2 α activates the stem cell factor Oct4 [9]. Consistent with this finding, Imamura et al. identified distinct sets of HIF-1 α and HIF-2 α target genes in SW480 colon cancer cells by cDNA microarray analysis [10].

Crosstalk has been reported between canonical Wnt signaling and HIF signaling in tumor progression and metastasis. However, the molecular mechanisms involved in this crosstalk remain poorly understood. Several reports have indicated that the activities of the transcription factors regulated by hypoxia play an important role in regulating stem cell quiescence [9] and that HIF-1 α -mediated Wnt activation promotes the maintenance of stem cell activity [11]. Mazumdar et al. showed that HIF-1 α modulates Wnt/ β -catenin signaling in hypoxic embryonic stem cells by enhancing β -catenin activation and the expression of the downstream effectors LEF-1 and TCF-1 [11]. In addition, there is experimental evidence supporting the hypothesis that both hypoxic conditions and canonical Wnt activation are involved in triggering an EMT program in many cancer cells [12,13]. Furthermore, crosstalk has been shown to exist between canonical Wnt signaling and HIF signaling in tumor progression and metastasis via the synergistic interaction of the Wnt target gene *c-MYC* with HIF-1 α [14,15]. In this regard, although normal physiological HIF-1 α responses in non-malignant cells can inhibit the activity of normal *c-Myc*, paradoxically, the deregulated expression of oncogenic *c-Myc* that exists in many cancers such as colorectal carcinoma works together with HIF-1 α to confer the tumor metabolic phenotype described as the Warburg effect or aerobic glycolysis as well as to promote angiogenesis [14].

Current knowledge of the homeostatic mechanisms that regulate the epithelial colon stemness and malignancy remains incomplete, preventing significant advancements in the treatment of colon carcinoma. This study examined the effects of stable HIF-1 α and HIF-2 α siRNA knockdown in malignant phenotype maintenance and in the transcriptional activity mediated by β -catenin. Our results indicate that although both HIF-1 α and HIF-2 α are essential for stemness and malignancy maintenance, these two proteins exert different effects and play opposing roles in canonical Wnt signaling.

Materials and Methods

Reagents and antibodies

The following antibodies were used in these experiments: allophycocyanin-conjugated mouse anti-CD44, mouse anti-CD44, and mouse anti-CD24 from BD Biosciences (San Jose, CA, USA); phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-CD133 from Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA); mouse anti-HIF-1 α , mouse anti-HIF-2 α , rabbit anti-Oct4, Alexa 647-conjugated rabbit anti-mouse,

Cy3-conjugated goat anti-rabbit, and mouse anti-lamin A/C from Millipore (Billerica, MA); rabbit anti- β -tubulin from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); biotin-conjugated mouse anti-CXCR4 from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA); mouse anti- β -catenin, mouse anti-cytokeratin 20 (CK20), rabbit anti-E-cadherin, rabbit anti-Snail 1, mouse anti-vimentin, rabbit anti-GSK-3 β , and goat anti-(p-Ser9)-GSK-3 β from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); Alexa647-conjugated goat anti-rabbit from Molecular Probes, Inc., (Eugene, OR, USA); and allophycocyanin-conjugated streptavidin from Biolegend (San Diego, CA, USA). Mouse IgG1 and IgG2b from US Biologicals (Massachusetts, MA, USA) were used at the same concentration as the primary antibody, as was the isotype matched control in the immunofluorescent staining and flow cytometry experiments. The Annexin V FLUOS Staining Kit from Roche Applied Science (Mannheim, Germany) was used to detect apoptotic and necrotic cells. The puromycin antibiotic and L-lactate dehydrogenase were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A growth factor-reduced Matrigel matrix was purchased from BD Biosciences. All other chemicals were of reagent grade.

Plasmids

The pTOPFlash and pFOPFlash reporter plasmids were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). The HRE-Luc reporter was obtained from Addgene (Plasmid 26731: HRE-luciferase), a non-profit organization dedicated to facilitating plasmid sharing among scientists. The control plasmid encoding a scrambled shRNA sequence was obtained from Santa Cruz Biotechnology. The control (void plasmid pSuper), HIF-1 α , and HIF-2 α RNAi plasmids were generous gifts from Dr. Daniel Chung, and their construction and effectiveness were described in a previous report [10].

Cell culture

All cancer cell lines and the non-malignant 112CoN cell line used here were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and cultured as previously described [16]. All of these cell lines were authenticated in January 2012 by Short Tandem Repeat DNA profiling performed at the Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) in Mexico City.

Western blotting

Samples of protein (50 μ g) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described in a previous report [14]. An actin antibody was used to control for equal loading.

Immunoprecipitation

The cells were washed and homogenized in ice-cold pH 7.5 lysis buffer containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100 and a mixture of protease inhibitors and protein phosphatase inhibitors. The protein concentration in the supernatant was measured using a detergent-compatible protein assay (Bio-Rad). Aliquots of these extracts (1 mg/ml) were incubated overnight at 4°C with 2 μ g/ml primary antibody with gentle shaking. Then, 25 μ l of protein A-sepharose (30%, Calbiochem) was added and incubated for 2 h. The immune complexes were then washed twice with buffer A (50 mM Tris-HCl and 0.6 M NaCl, pH 8.3) supplemented with 0.1 mg/ml trypsin inhibitor and 1 mM PMSF,

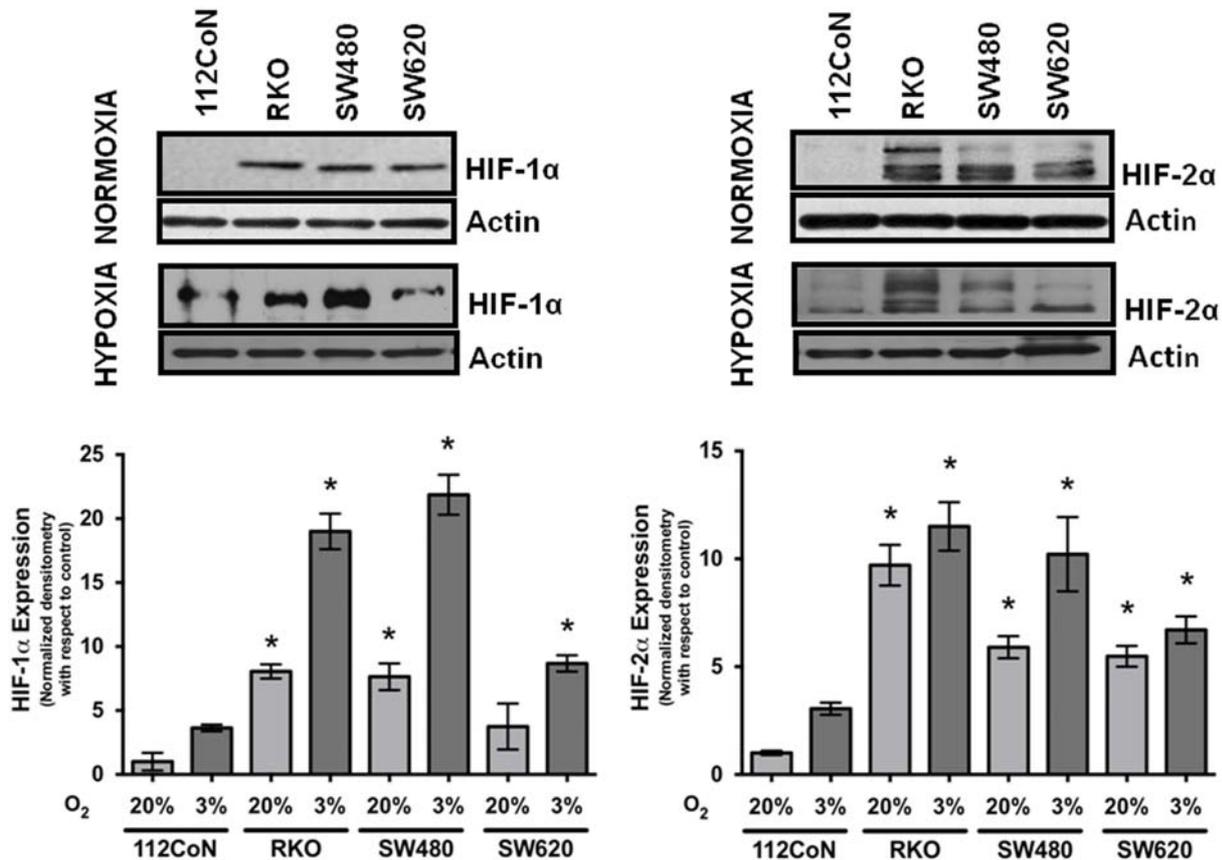


Figure 1. HIF-1 α and HIF-2 α are co-expressed in colon cancer cells but not in non-malignant cells under normoxic conditions. Normal colon (112CoN) or colon cancer cells were cultured under normoxia (20% O₂) or hypoxia (3% O₂) for 12 h. Total cell extracts of the colon cell lines were prepared, and the samples were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. An immunoblot analysis was performed using anti-HIF-1 α or anti-HIF-2 α antibodies as indicated in the figure, and developed using a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. Actin antibody was used to control for equal loading. A densitometric analysis was performed to estimate the levels of HIF-1 α and HIF-2 α expression, which were normalized to the corresponding expression levels in non-malignant 112CoN cells. All of the assays were performed in triplicate, and the data represent the means \pm SEM from at least three independent assays. * $p < 0.05$.
doi:10.1371/journal.pone.0112580.g001

and once with buffer B (50 mM Tris HCl and 0.15 M NaCl, pH 7.5) containing protease and phosphatase inhibitors.

HIF-1 α or HIF-2 α knockdown

To induce the stable silencing of HIF-1 α or HIF-2 α , the cells were transfected with the pSuper HIF-1 α or HIF-2 α RNAi plasmid, which were constructed and analyzed by Dr. Daniel Chung as described in a previous report [10] or with the control plasmid (encoding a scrambled shRNA sequence or pSuper void plasmid) using Lipofectamine 2000. To generate stable transfections, the cells were transfected with either 1 μ g of the control plasmid or 1 μ g of pSuper HIF-1 α RNAi or HIF-2 α RNAi plasmids. Stable transfectants were selected with 3 μ g/ml puromycin (Sigma) for four weeks, and the clones were selected and screened for HIF-1 α or HIF-2 α silencing by flow cytometry.

FACS analysis

The cells were detached and dissociated in 10 mM EDTA solution. The cell suspension was washed, resuspended in PBS supplemented with 4% fetal calf serum (FCS) (staining buffer), stained with the corresponding primary antibody, and then incubated with the secondary antibody. Cells stained with the secondary antibody alone were used as a negative control. For nuclear staining, nuclei were purified from the cell samples using a

Nuclei Isolation Kit (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The nuclei were washed, fixed, permeabilized, blocked, and labeled with anti β -catenin and Alexa 647-conjugated goat anti-mouse antibody in staining buffer. As a negative control, nuclei maintained in separate tubes were probed in parallel with Alexa 647-conjugated goat anti-mouse antibody. After a final wash, the nuclei were fixed and analyzed by flow cytometry.

Lactate measurement assay

The amount of lactate the cancer cells secreted into the culture medium was measured using an enzymatic assay using L-lactate dehydrogenase (Sigma). In this assay, the lactate secreted into the culture medium sample is reduced to pyruvate and NADH in the presence of lactate dehydrogenase (LDH) (Sigma) and excess NAD. The amount of NADH formed in the reaction, measured by the change in absorbance at 340 nm, is proportional to the concentration of lactate present in the sample. To avoid interference with the LDH that may already be present in the serum used to supplement the culture medium, the samples were subjected to deproteinization with 8% trichloroacetic acid (TCA) to render them protein-free prior to the assay.

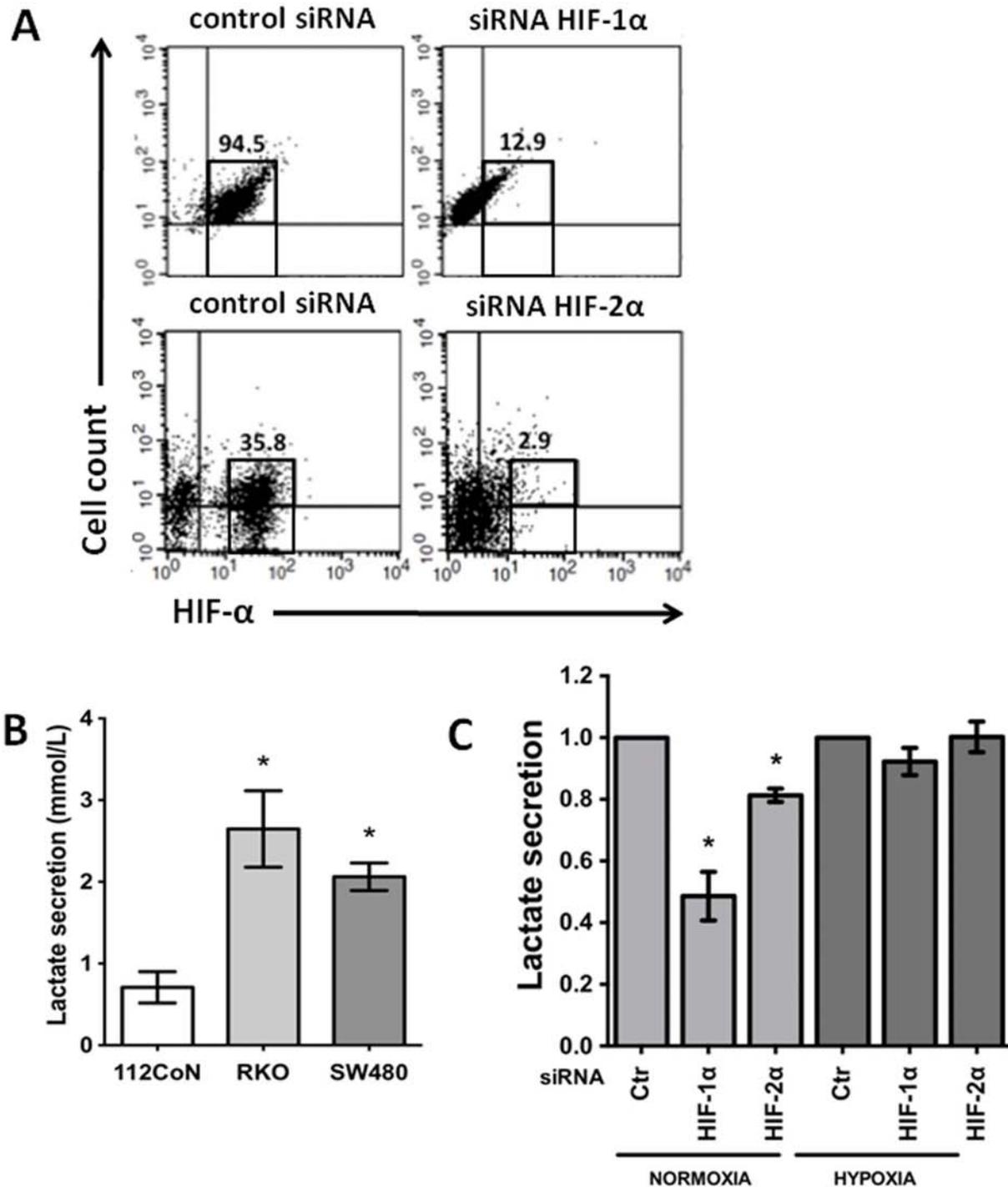


Figure 2. Stable knockdown of HIF-1 α but not HIF-2 α decreases lactate production by colon cancer cells. A) Stable HIF-1 α - or HIF-2 α -knockdown or control (scrambled shRNA plasmid) transfectants were obtained as described in the "Materials and Methods". Selected clones were screened by flow cytometry to assess the silencing of HIF-1 α and HIF-2 α in comparison with the control cells. **B)** Lactate secretion was significantly increased in colorectal cancer cell lines compared with non-malignant 112CoN cells. **C)** Changes in lactate secretion by HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced SW480 cells in comparison with the control cells (Ctr in the figure) cultured under normoxia (20% O₂) or hypoxia (3% O₂) for 24 h. L-lactate was determined by an LDH enzymatic assay as described in the "Materials and Methods". All of the assays were performed in triplicate, and the data represent the means \pm SEM from at least three independent assays. *: $p < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0112580.g002

Apoptosis

SW480 control or HIF-1 α or HIF-2 α -silenced cells were seeded onto 24-well plates at a density of 1.5×10^5 cells per well. Twenty-

four hours after seeding, the cells were incubated in the absence or presence of the apoptosis inducer H₂O₂ (1 mM) for 12 h. Apoptosis was measured by flow cytometry using the Annexin V FITC kit (Roche) as recommended by the manufacturer's

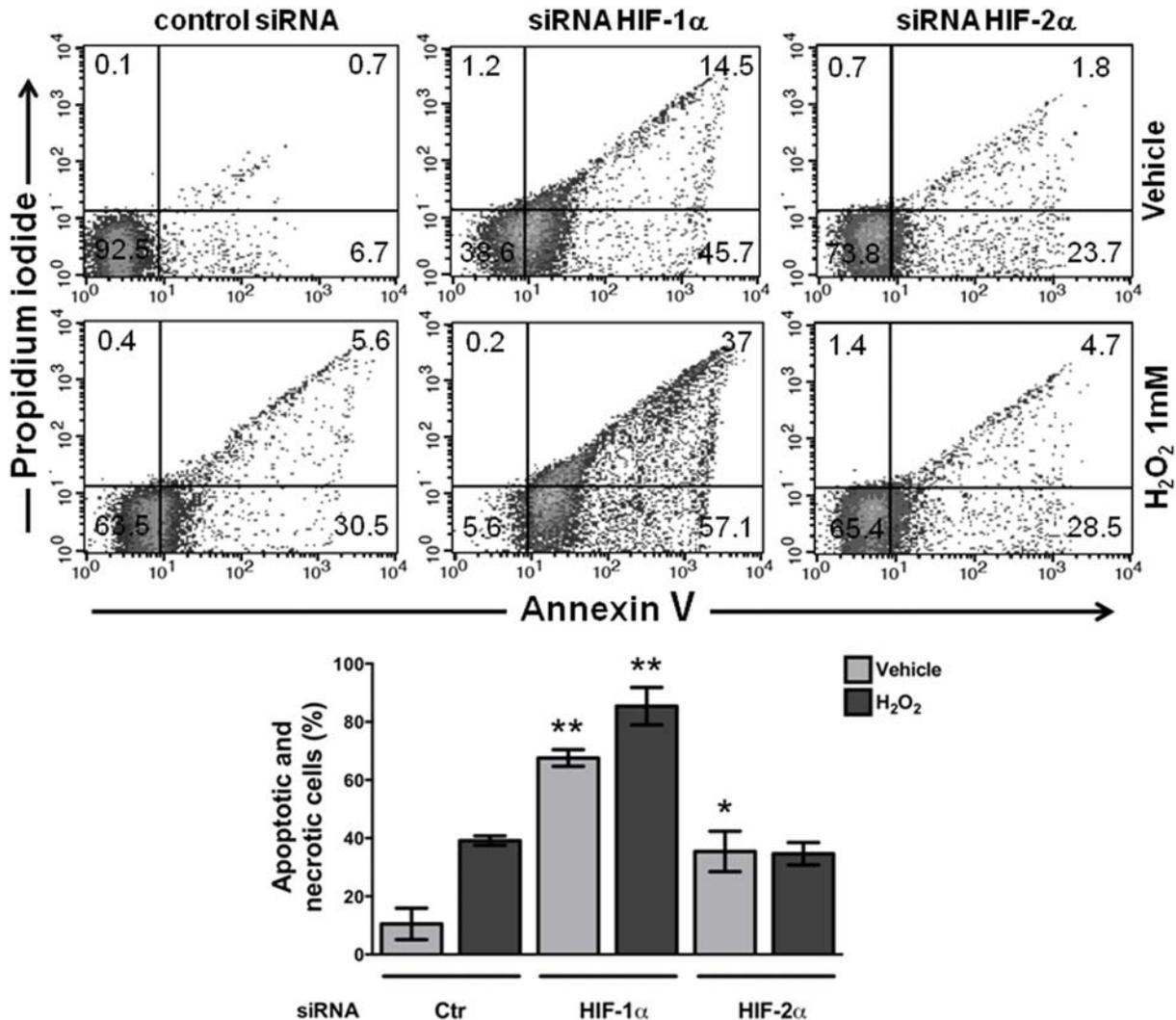


Figure 3. HIF knockdown increased the apoptosis of SW480 cells. Apoptosis was induced by culturing the HIF-silenced or control (transfected with scrambled shRNA plasmid and indicated in the figure as Ctr) cells in the absence or presence of 1 mM H₂O₂ for 12 h. SW480 cells were trypsinized, washed twice with PBS, and untreated (vehicle) or treated with H₂O₂ for 12 h. The cultures were stained with Annexin V and PI, as described in the "Materials and Methods", and analyzed by flow cytometry. All of the assays were performed in triplicate (a representative histogram of the data is shown), and the graph presents the means \pm SEM from three independent experiments; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0112580.g003

instructions. Necrosis was measured by propidium iodide (PI) permeability in the absence of detergent. The percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry.

Wound-healing assay

Control or HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced SW480 cells were seeded to confluence onto poly-L-lysine coated slides in DMEM F12 supplemented with 5% FBS. After 24 h, a scratch was produced using a sterile pipette tip. The cultures were washed with PBS. At this time point ($t = 0$ h), the wound margins were photographed. The cells were then cultured in medium supplemented with 0.05% FBS for up to 72 h, and the wound margins were photographed at different time points.

Migration assay

The chemotactic response to the stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) of the HIF-1 α and HIF-2 α -silenced and control cells was assessed using Boyden chambers (3 μ m pore size). A total of 1×10^5

cells were added to the upper part of the chamber, and the lower part of the chamber contained SDF-1 α (200 ng/ml in 0.05% FBS). To obtain the absolute numbers of migratory cells, flow cytometric counts for each sample were obtained for a constant, predetermined volume and then compared with duplicate flow cytometric counts obtained from the control wells.

Xenograft tumor model

Selected clones of stable control-, HIF-1 α -, or HIF-2 α -transfected cells were selected and screened by flow cytometry to determine the HIF-1 α and HIF-2 α silencing efficiency in comparison with the control cells. The cells displaying the highest knockdown efficiency were cultured and used for xenotransplantation into immunocompromised mice. For each injection site, 1×10^6 HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced cells were resuspended in a high concentration of Matrigel (BD Biosciences), diluted in PBS to a final concentration of 50% and subcutaneously (s.c.) injected into the flanks of six-week-old nude mice ($n = 5$). Each mouse was

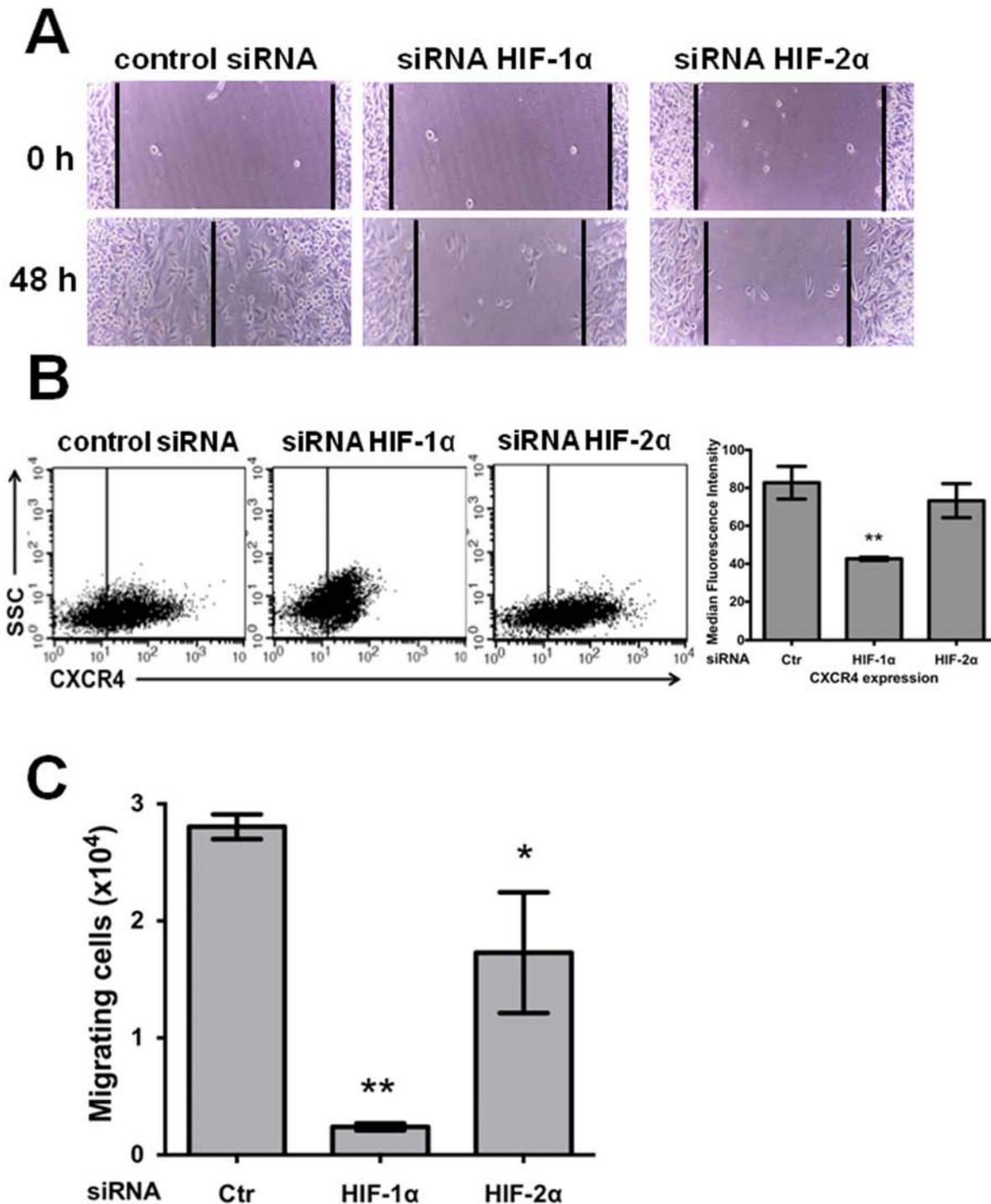


Figure 4. Stable knockdown of both HIF-1 α and HIF-2 α decreased the cell migration of SW480 cancer cells, but only HIF-1 α knockdown severely affected CXCR4-mediated chemotaxis. **A**) A wound-healing assay was used to determine whether cellular migration is dependent on either HIF-1 α or HIF-2 α expression. SW480 knockdown and control (scrambled shRNA plasmid) cells were grown to confluence on 24-well tissue culture plates, and the wound-healing assay was performed as described in the "Material and Methods". The scratched area was imaged immediately after wounding (time 0) and 48 h after wounding. These images are representative of three independent experiments. **B**) CXCR4 expression decreased as a result of HIF-1 α knockdown. SW480 control or silenced cells, as indicated in the figure, were detached using EDTA and washed, and 1×10^5 cells were incubated with mouse biotin-conjugated anti-CXCR4 and allophycocyanin-conjugated streptavidin antibody and examined by flow cytometry. The data show the median fluorescence intensities of CXCR4 expression and SSC (side-scattered light, proportional to cell granularity), and represent the mean values \pm SEM from three independent experiments. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. **C**) Significant differences were observed in the SDF-1 α -induced chemotactic response. The chemotactic response to SDF-1 α of the HIF-1 α - or HIF-2 α -knockdown or control cells (Ctr in the figure) was assessed using Boyden chambers as described in the "Materials and Methods". The cells were incubated for 48 h to allow for migration and recovered using EDTA. The results represent the means \pm SEM from three experiments performed in duplicate. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0112580.g004

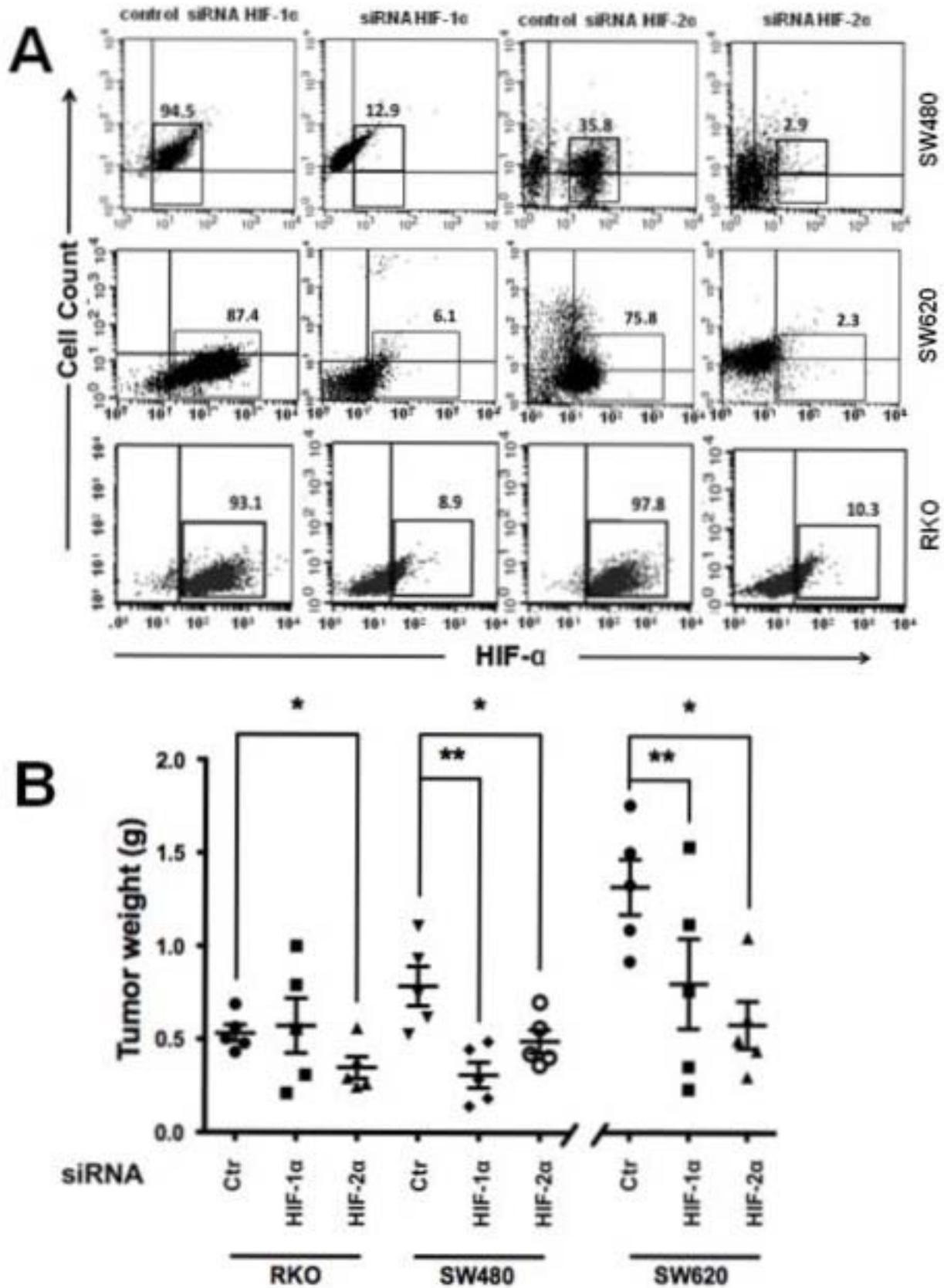


Figure 5. Stable silencing of HIF-1 α or HIF-2 α decreased the *in vivo* tumorigenic activity of engrafted colon cancer cells. **A)** Stable HIF-1 α - or HIF-2 α -knockdown or control transfectants were obtained as described in the "Materials and Methods" from the RKO, SW480, and SW620 colon cell lines. Selected clones were screened by flow cytometry to determine the silencing of HIF-1 α and HIF-2 α in comparison with the control cells. **B)** A total of 1×10^6 stable control (Ctr in the figure) or HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced RKO, SW480, or SW620 cells were s.c. injected into the dorsal

region of healthy six-week-old female immunocompromised nude mice ($n = 5$ for each condition). Each mouse was injected in the upper right flank with control cells, in the bottom right flank with HIF-1 α -silenced cells, and in the bottom left flank with HIF-2 α -silenced cells. A total of 1×10^5 cells in 100 μ l of growth factor-reduced Matrigel were transplanted at each site. After four weeks (RKO and SW480 cells) or two weeks (SW620 cells), the mice were euthanized, and the tumors were removed and weighed. The data represent the means \pm SEM from $n = 5$ for each experimental condition. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0112580.g005

injected in the upper right flank with control cells, into the bottom right flank with HIF-1 α -silenced cells, and into the bottom left flank with HIF-2 α -silenced cells.

For xenotransplants using CD44⁻/CD133⁻ or CD44⁺ subpopulations, cells were obtained from SW480 cells stably transfected with the control pSuper plasmid or with pSuper HIF-1 α or HIF-2 α RNAi by FACS cell sorting. The purified subpopulations for each condition were collected by trypsinization. Then, 1×10^4 cells per injection site were resuspended in growth factor-reduced Matrigel matrix, diluted in PBS to a final concentration of 50% and s.c. injected into the flanks of six-week-old nude mice. Each mouse ($n = 5$ for each condition) was injected into the right flank with CD44⁻/CD133⁻ cells and into the left flank with CD44⁺ cells purified from each condition (control, HIF-1 α knockdown, or HIF-2 α knockdown). Four weeks (for RKO or SW480-derived cells) or two weeks (for SW620-derived cells) after inoculation, the animals were euthanized and the tumors were removed and weighed.

Transfection and luciferase reporter gene assay

The cells were seeded on 24-well plates at a density of $1.2\text{--}1.8 \times 10^5$ cells per well. Twenty-four hours after seeding, the cells were placed in serum-free medium and transfected with 1 μ g of a reporter plasmid (pTOPFlash) or control plasmid (pFOPFlash) and with 0.05 μ g of the pRL luciferase plasmid or CMV-GFP plasmid (transfection control). The luciferase reporter activity in the cell lysates was measured 24 h after transfection using the Dual Luciferase Assay kit (Promega, Madison, WI, USA). The activity was normalized with respect to the activity of *Renilla* luciferase or with respect to the protein content in each sample.

Immunofluorescence analysis

SW480 control or HIF-1 α - or HIF-2 α knockdown cells were grown on coverslips. The cells were fixed, permeabilized and co-immunostained with antibodies against β -catenin, E-cadherin, vimentin and Snail 1. The fluorescence was analyzed by laser confocal microscopy as described in a previous report [16]. β -catenin and vimentin were visualized with Alexa 647-conjugated goat anti-mouse antibody, and E-cadherin and Snail 1 were visualized with Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody. The cell fluorescence was imaged using a confocal microscope (Leica TCS SP5) with a krypton argon laser. A control sample of cells was stained with the secondary antibody only to confirm that no fluorescence signal was detected from these cells.

Ethics statement

All of the animals were handled in strict accordance with good animal practices as defined by the Animal Experimental Bioethics Guidelines of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México. In addition, all animal studies were approved by the Animal Experimental Bioethics Committee of the Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México. When indicated, the mice were euthanized with CO₂.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical data analysis was performed using Student's *t* test or a one-way-ANOVA with Tukey's multiple comparison test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

HIF-1 α and HIF-2 α are expressed in colon cancer cells but not in non-malignant cells under normoxic conditions

Hypoxia is a common condition observed in a wide range of solid tumors, and HIF over-expression is frequently associated with metastasis and poor clinical outcomes. *In vivo*, hypoxia is also likely to be a functional component of a normal stem cell niche. However, the importance of hypoxia in CSC maintenance remains largely unknown [17]. Because high HIF expression has been detected in tumor cells in the absence of hypoxia, we compared the expression of these factors in cultured colon cancer cells under normoxic and hypoxic conditions with cultured non-malignant 112CoN cells that were incubated under the same conditions by western blot. The results shown in Figure 1 indicate that as expected, hypoxia (3% O₂) induced the expression of both HIF-1 α and HIF-2 α in both normal (112CoN) and cancerous cells; however, under normoxic culture conditions (20% O₂), only the colon cancer cells co-expressed both HIF-1 α and HIF-2 α , while the non-malignant 112CoN cells did not express these factors under normoxic conditions.

Stable knockdown of HIF-1 α but not HIF-2 α decreases lactate production by colon cancer cells under normoxic conditions

To understand the roles played by HIFs in cancer phenotype maintenance and their possible interaction with canonical Wnt signaling, we examined the effects of the stable knockdown of HIF-1 α and HIF-2 α by siRNA in SW480 cells, which exhibit constitutively active canonical Wnt signaling. The plasmids used in this study were constructed and previously successfully probed by Dr. Daniel C. Chung [10], who kindly donated the plasmids to us. SW480 cells were transfected with the control scrambled shRNA plasmid, pSuper HIF-1 α RNAi, or pSuper HIF-2 α RNAi. Stable transfectants were selected using an antibiotic for four weeks, and the clones were selected and screened by flow cytometry for HIF-1 α and HIF-2 α silencing in comparison with the control cells. Stable transfectants exhibiting a decrease of at least 85% in HIF-1 α expression and a decrease of at least 90% in HIF-2 α expression were obtained and selected by flow cytometry as shown in Figure 2A. Cancer cells exhibit increased glycolysis and lactate production and decreased O₂ consumption compared with non-transformed cells, a phenomenon known as the Warburg effect [18]. Consistent with this effect, Figure 2B shows that a significant increase in lactate production was apparent in the SW480 and RKO colon cancer cells compared with the non-malignant 112CoN colon cells. We then examined the effects of the stable silencing of each HIF on lactate production by SW480 cancer cells under normoxia or hypoxia. As observed in Figure 2C, the stable knockdown of HIF-1 α in SW480 cells

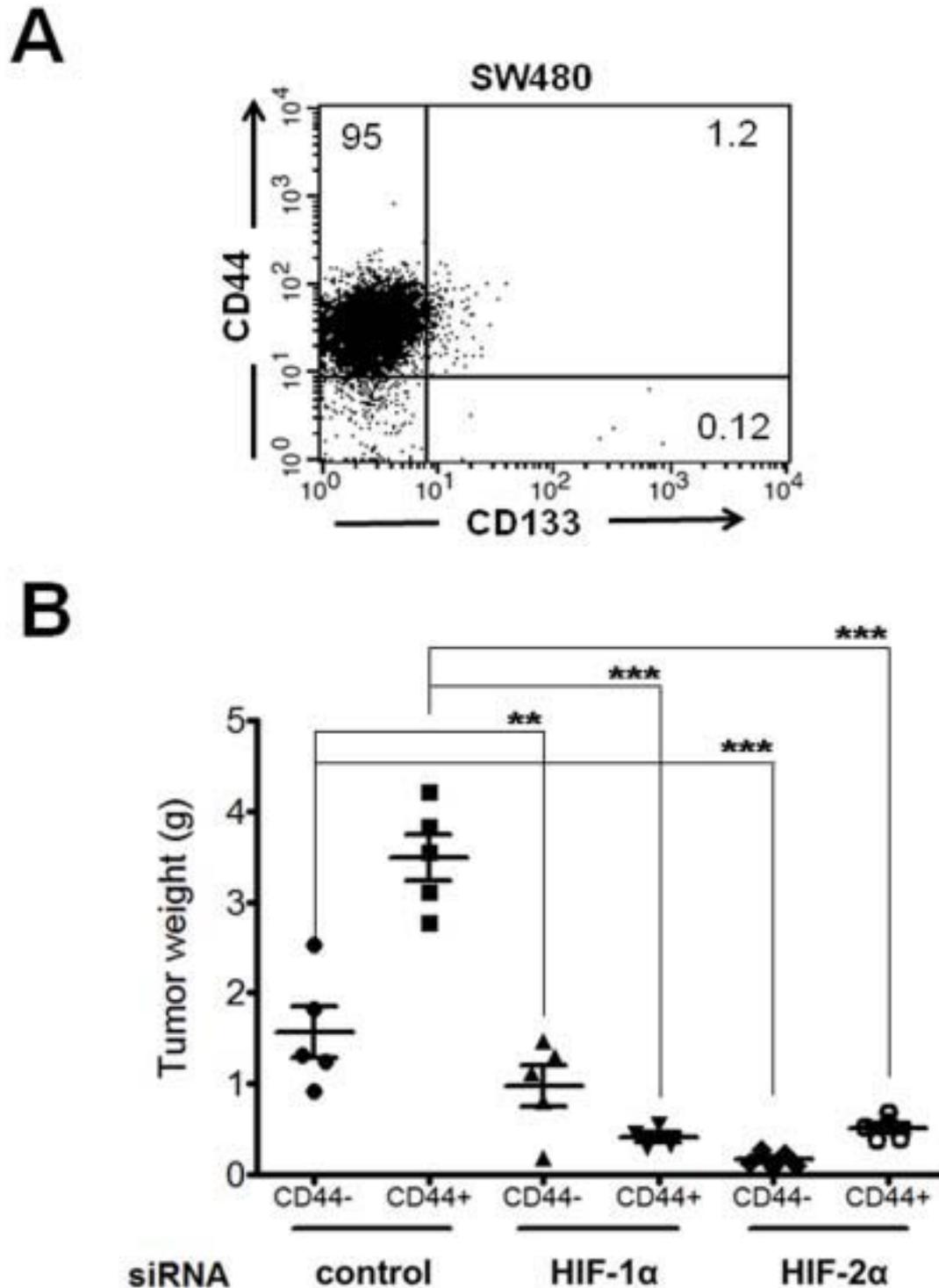


Figure 6. Decreased *in vivo* tumorigenic activity of FACS-purified CD44⁺ and CD44⁻/CD133⁻ subpopulations from control or HIF-1 α or HIF-2 α -knockdown SW480 cells. **A)** Analysis of CD44/CD133 expression profiles in the SW480 colorectal cancer cell line. The cells were incubated in the presence of EDTA and washed, and 1×10^5 cells were incubated with PE-conjugated anti-CD133 and allophycocyanin-conjugated anti-CD44 antibodies for 15 min at 4°C and examined using flow cytometry. **B)** The CD44⁺ (population corresponding to the upper left quadrant in panel A) or CD44⁻/CD133⁻ (population corresponding to the lower left quadrant) subpopulations from the stable control or HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced cells were obtained by FACS cell sorting. The purified subpopulations were s.c. injected into the dorsal region of healthy six-week-old immunocompromised nude mice ($n = 5$ for each condition). Each mouse was injected in the right flank with the CD44⁻ cells and in the left flank with the CD44⁺ cells. A total of 1×10^4 cells in 100 μ l of growth factor-reduced Matrigel were transplanted at each site. Four weeks after inoculation, the animals were euthanized, and the tumors were removed and weighed. The data represent the means \pm SEM for each experimental condition with $n = 5$. **: $p < 0.05$; ***: $p < 0.01$.
doi:10.1371/journal.pone.0112580.g006

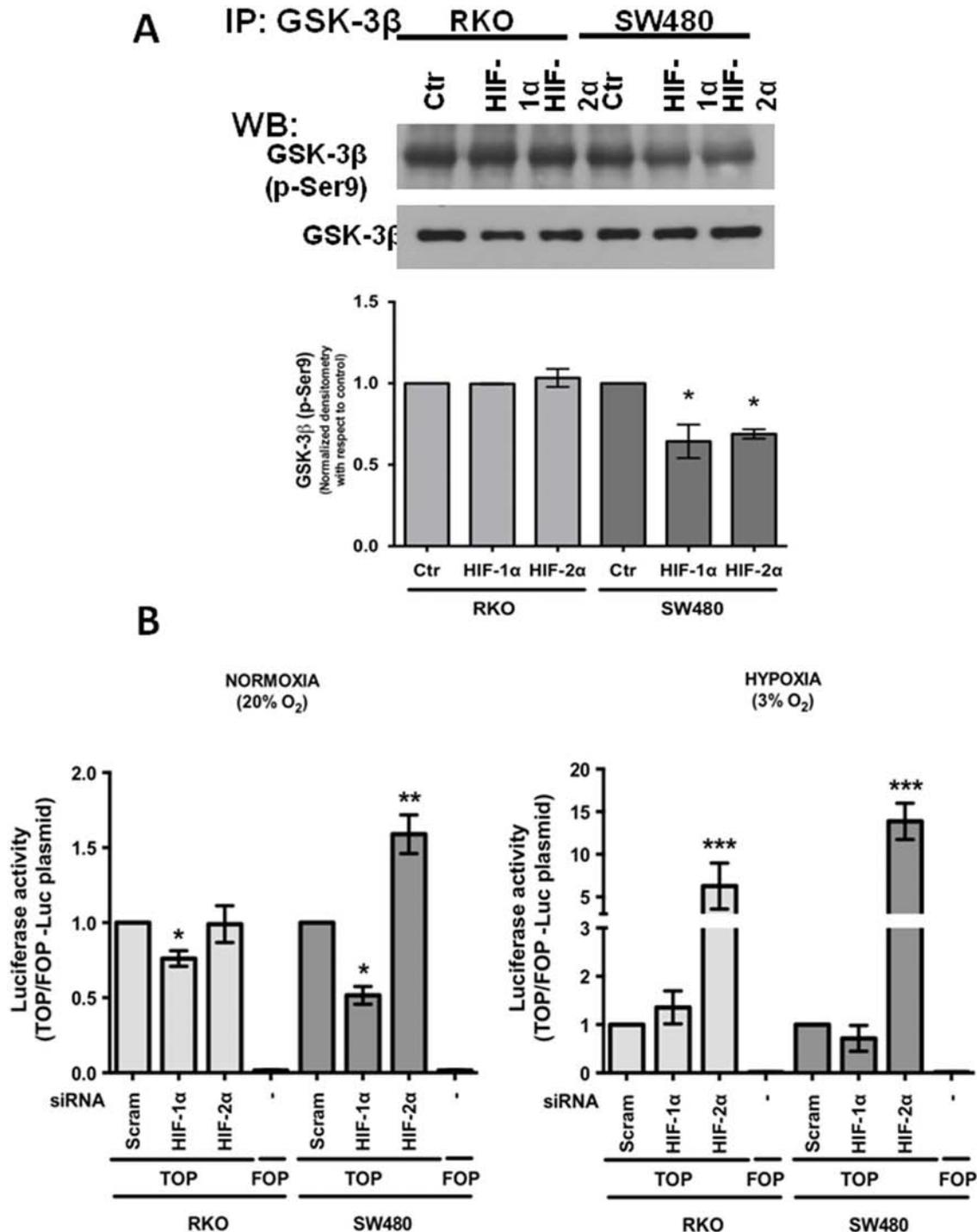


Figure 7. HIF-1 α and HIF-2 α knockdown produced opposite effects in canonical Wnt signaling. **A**) Stable HIF-1 α - or HIF-2 α -depleted cells exhibit decreased levels of the inactive (p-Ser9)-GSK-3 β form. Stable control (scrambled shRNA, Ctr in the figure) or HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced RKO or SW480 colon cancer cells were cultured under normoxia. Total cell extracts of the colon cell lines were prepared, and the samples were subjected to 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. An immunoblot analysis was performed using anti-GSK-3 β or anti-(p-Ser9)-GSK-3 β , as indicated in the figure, and developed using a horseradish peroxidase-conjugated second antibody. Densitometric analysis was performed to estimate the level of (p-Ser9)-GSK-3 β with respect to the level of total GSK-3 β . All of the assays were performed in triplicate, and the data represent the means \pm SEM from at least three independent assays. *: $p < 0.05$. **B**) Stable control (scrambled shRNA, "Scram" in the figure) or HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced SW480 or RKO cells were transiently transfected with the pTOPFlash or pFOPFlash (control) reporter plasmids. At 24 h post-transfection, the cells were incubated under normoxic (20% O₂) or hypoxic conditions (3% O₂) for 12 h. The cells were washed and lysed, and the luciferase activity was assayed. The activity was normalized with respect to the activity of *Renilla* luciferase or with respect to the protein content in each sample. All of the assays were performed in quintuplicate, and the data represent the means \pm SEM from at least five independent assays. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0112580.g007

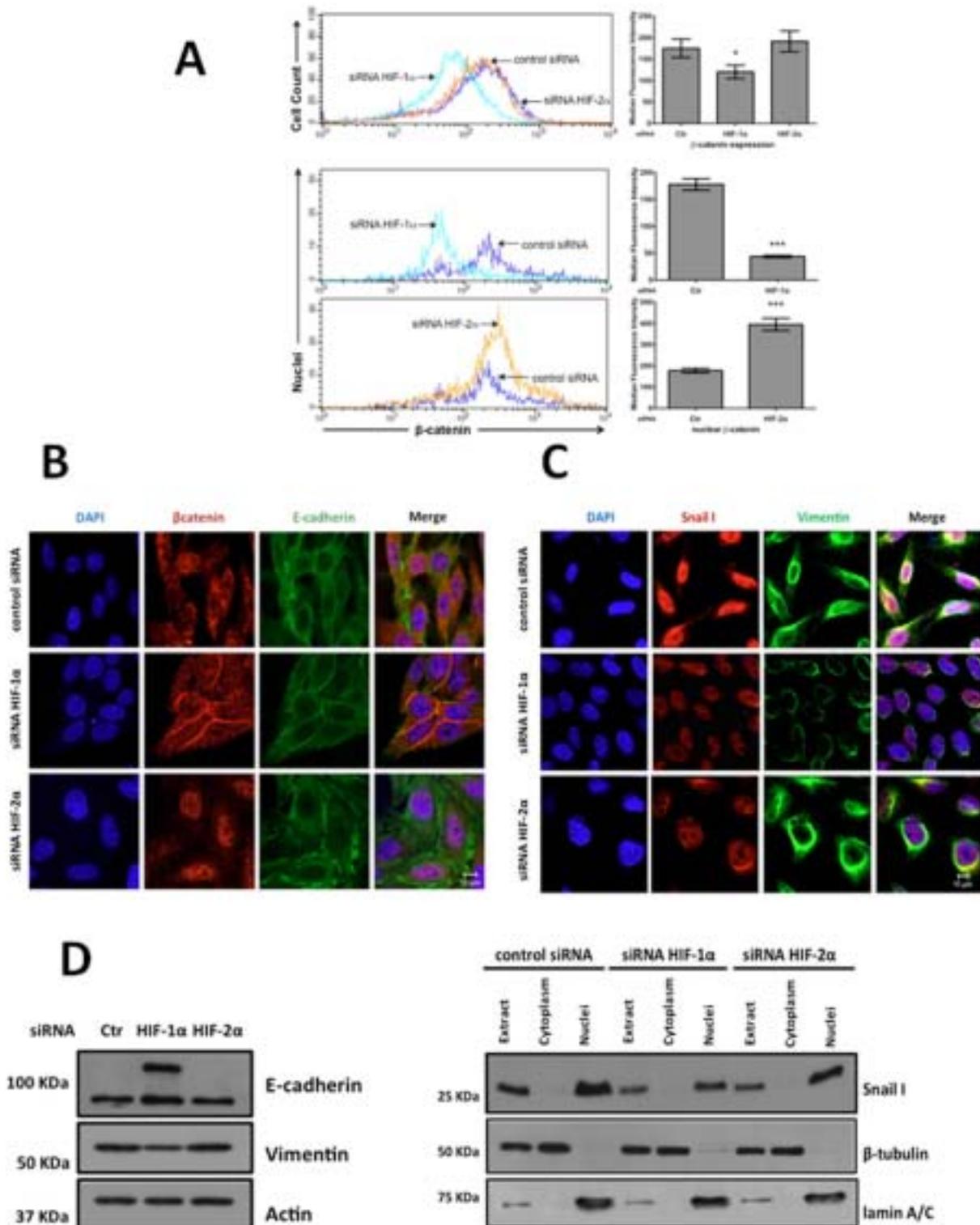


Figure 8. Stable knockdown of HIF-1 α in SW480 cells results in decreased β -catenin expression levels and co-localization of β -catenin with E-cadherin at the cell membrane. **A)** Upper panel: Decreased β -catenin expression in HIF-1 α -knockdown SW480 cells. The cells were incubated in the presence of EDTA, washed, and incubated with mouse anti- β -catenin antibody. The cells were washed and stained with goat Alexa647-conjugated anti-mouse secondary antibody and examined by flow cytometry. Controls stained with only the secondary antibody were prepared and were used as controls (not shown). The figure shows the overlapping histograms of the labeled SW480 control cells (blue line and Ctr in the bar graph), HIF-1 α -silenced cells (green line), and HIF-2 α -knockdown cells (orange line). The bar graph on the right shows the means of the median fluorescence intensity \pm SEM from at least four independent experiments. *: $p < 0.05$. **Middle panel:** Quantification of β -catenin in nuclei isolated from SW480 control (scrambled shRNA) or HIF-1 α -depleted cells. **Lower panel:** Quantification of β -catenin in nuclei isolated from SW480 control (scrambled shRNA) or HIF-2 α -depleted cells. The nuclei were purified and labeled with anti- β -catenin and with Alexa 647-conjugated goat anti-mouse antibody in staining buffer as described in the "Materials and Methods". After the final wash, the nuclei were fixed and analyzed by flow

cytometry. Independent gates were generated for intact cells and for isolated nuclei stained with propidium iodide prior to the flow cytometry analysis. The figure shows the overlapping histograms of the labeled SW480 control cells (blue line and Ctr in the bar graph), HIF-1 α -knockdown cells (green line), and HIF-2 α -knockdown cells (orange line). A representative histogram from at least three independent experiments is shown. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$. **B**) and **C**) Stable control (scrambled shRNA) or HIF-1 α - or HIF-2 α - silenced SW480 cells were fixed, permeabilized, and co-immunostained with antibodies against β -catenin and E-cadherin (panel B) or against Snail 1 and vimentin (panel C). Nuclear staining was obtained by incubating the coverslips with 4',6-diamidino-2-phenylindol (DAPI). The fluorescence was analyzed by laser confocal microscopy as described in the "Materials and Methods". E-cadherin and vimentin were visualized with Cy3-conjugated goat anti-rabbit antibody, and β -catenin and Snail 1 were visualized with Alexa 647-conjugated goat anti-mouse antibody. Controls were stained only with the secondary antibody, and no fluorescence signals were obtained from these controls (not shown). The data are representative of three independent experiments. Scale bar: 10 μ m. D) Expression analysis of the EMT-related markers by western blot. Cytoplasmic and nuclear fractions were obtained from the cell extracts of control (Ctr in the figure) or HIF-1 α - or HIF-2 α - silenced SW480 cells using a nuclear isolation kit (Sigma), and the presence of the proteins indicated in the figure was analyzed in each fraction and in cell extracts by western blot. β -tubulin and lamin A/C were employed as a cytoplasmic marker and a nuclear marker, respectively, to confirm a lack of contamination and thus successful fractionation. The data are representative of three independent experiments. doi:10.1371/journal.pone.0112580.g008

decreased the lactate production by at least 50% compared with the control cells under normoxic conditions, whereas HIF-2 α knockdown only led to a 20% decrease in lactate secretion compared with control cells under the same conditions (Figure 2B). After 12 h of exposure to acute hypoxia, the levels of HIF proteins were elevated, and the levels of lactate production recovered (Figure 2C). Thus, to avoid HIF overexpression, which could override the knockdown efficiency (shown in Figure S1) and make it difficult to dissect the role played by each HIF in the maintenance of the malignant phenotype, we decided to perform most analyses under normoxic conditions.

Stable knockdown of HIF-1 α or HIF-2 α produced an increase in the basal or H₂O₂-induced apoptosis in SW480 colon cancer cells

It is well established that HIF-1 α promotes cell survival and apoptosis resistance in several cell systems under hypoxia. We explored whether the blockade of HIF-1 α or HIF-2 α expression in cancer cells that express both factors under normoxia also affects cellular survival. We used hydrogen peroxide to induce acute apoptosis because it has been widely reported to be a potent inducer of apoptosis in cancer cells due to the production of severe oxidative stress. HIF-silenced SW480 cells were treated with 1 mM H₂O₂ for 12 h, and then the degree of cell apoptosis was determined by Annexin V-PI staining followed by flow cytometry analysis. Both apoptosis and necrosis were enhanced under normoxia as a result of HIF-1 α or HIF-2 α silencing compared with the control cells, even in the absence of the apoptosis inducer (upper part of Figure 3). However, the proportion of apoptotic and necrotic cells obtained as a result of HIF-1 α silencing was greater than that induced by HIF-2 α knockdown with respect to the controls, and this effect was more evident when the cells were treated for 12 h with 1 mM H₂O₂ (Figure 3). Thus, these results suggest that HIFs, particularly HIF-1 α , are involved in the promotion of cell survival and resistance to apoptosis.

Stable knockdown of HIF-1 α or HIF-2 α diminished the cell migration of SW480 cancer cells, but only HIF-1 α knockdown severely affected CXCR4-mediated chemotaxis

We performed wound-healing assays to investigate the effects of these proteins on cell migration. Stable HIF-1 α - or HIF-2 α -silenced cells were grown under normoxia to confluency, and then scratches were made on the monolayer. Images of the scratches were captured at 0 and 48 h, and the scratch area was analyzed at these time points. As can be observed in Figure 4A, in comparison to the controls, migration was blocked by the knockdown of HIF-1 α or HIF-2 α (please see reference limit lines drawn on the pictures). In addition, the evaluation of cellular migration based on

the chemotactic activity towards SDF-1 α mediated by the CXCR4 receptor revealed that CXCR4 expression was decreased as a result of HIF-1 α but not HIF-2 α knockdown (Figure 4B). Consistent with this finding, the silencing of HIF-1 α expression nearly abolished the SDF-1 α -CXCR4-mediated migration of cancer cells through Transwell chambers, whereas the silencing of HIF-2 α expression decreased cell migration by only 45% with respect to the controls (Figure 4C).

Stable silencing of HIF-1 α or HIF-2 α decreased the in vivo tumorigenic activity of engrafted colon cancer cells

The effect of the stable siRNA-mediated knockdown of HIFs on the tumorigenic activity of colon cancer cells was studied using a xenograft model in immunocompromised nude mice. We examined this effect using representative colon cancer cell lines that exhibit different Wnt genetic contexts: human RKO malignant cells that have normal canonical Wnt signaling (these express the wild-type APC protein) and human SW480 malignant cells, which express a truncated version of APC and have constitutively active Wnt signaling. We also used SW620 cells, which are derived from a metastasis of the same tumor from which the SW480 cells were derived. Stable cells transfected with the control pSuper plasmid or with pSuper HIF-1 α or HIF-2 α were selected, and the silencing efficiency was determined by flow cytometry as shown in Figure 5A. The cells exhibiting the highest knockdown efficiency were selected by FACS, grown, and injected s.c. into the flanks of NOD/SCID mice. In these same animals, control cells were injected s.c. into the upper flank, and HIF-1 α - and HIF-2 α -silenced cells were injected s.c. into the bottom right flank and the bottom left flank, respectively. After four weeks (RKO and SW480 cells) or two weeks (SW620 cells), the mice were euthanized, and the tumors were removed and weighed. As can be observed in Figure 5B, the HIF-1 α - or HIF-2 α -depleted colon cancer cells exhibited a decrease in tumorigenic activity in the grafted mice compared with the controls; however, this trend was not observed with the RKO cells, in which HIF-1 α silencing did not significantly inhibit tumorigenic activity. Note that the negative effects were more evident in colon cancer cells that exhibit altered Wnt signaling, particularly in the metastatic HIF-silenced SW620 cells, which as expected based on their more aggressive phenotype, exhibited larger xenografts in less time (two weeks instead of four) than the non-metastatic cells. Based on these results, we then examined the effects of the knockdown of HIF-1 α or HIF-2 α in CSCs.

Several colorectal cancer CSC markers have been reported to date, including CD133, CD44, CD24, CD166, and Lgr-5 [19]. Because CD133 and CD44 have been widely validated as CSC markers in a variety of solid tumors, we analyzed their expression profile in SW480 cells by FACS. As shown in Figure 6A, these cells are highly enriched in CD44⁺ but do not express CD133, in

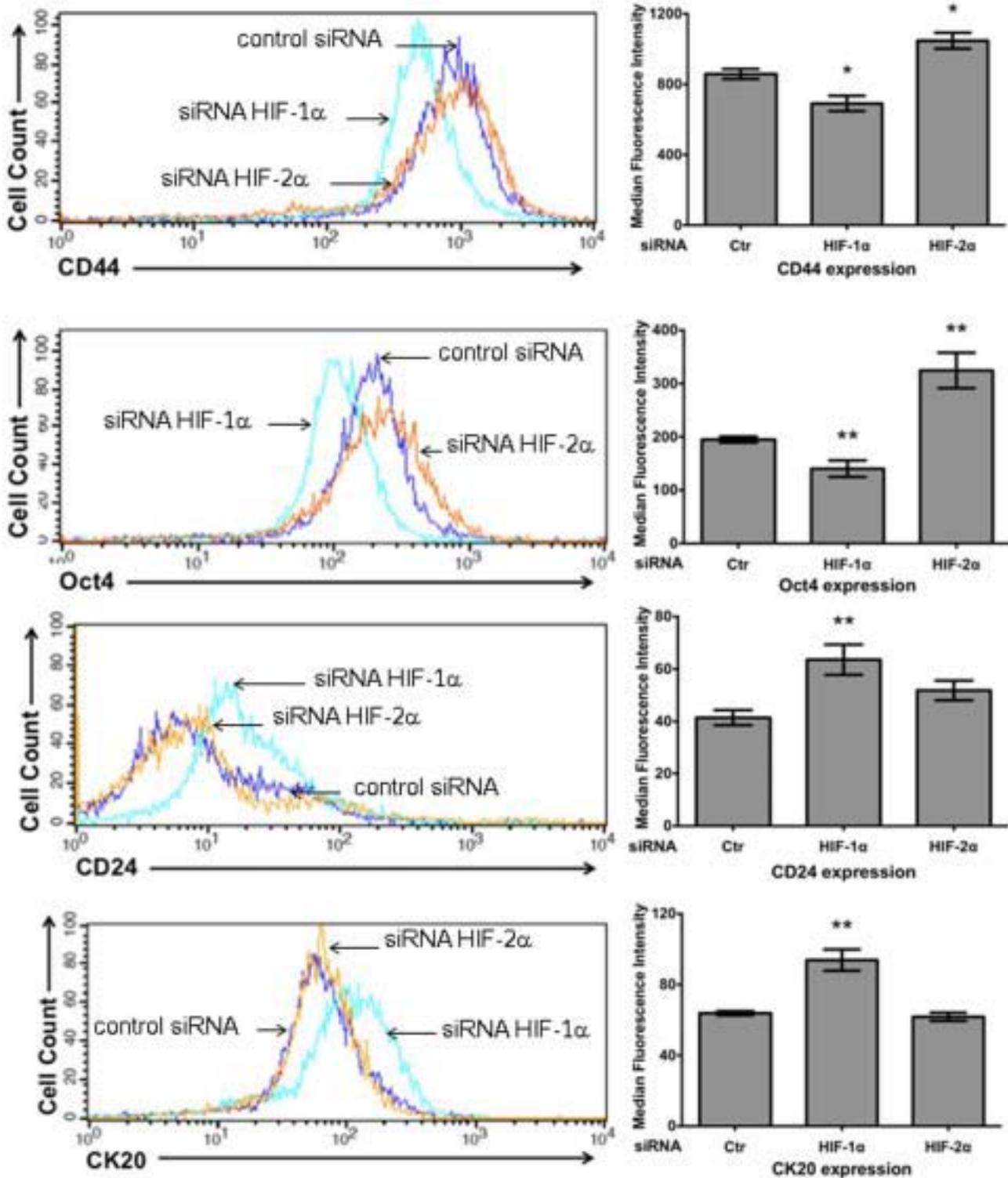


Figure 9. HIF-1 α and HIF-2 α knockdown exerted opposing effects on the expression of the stem cell markers CD44 and Oct4, but only HIF-1 α depletion increased the expression of the differentiation marker CK20. Stable control (scrambled shRNA plasmid) or HIF-1 α - or HIF-2 α - silenced SW480 cells were incubated in the presence of EDTA, washed, and incubated with mouse anti-CD44, rabbit anti-Oct4, mouse anti-CD24 or mouse anti-CK20 antibodies. The cells were washed, stained with Alexa 647-conjugated goat anti-mouse/rabbit secondary antibody, and examined by flow cytometry. The figure shows the overlapping histograms of labeled SW480 control cells (blue line and Ctr in each bar graph), HIF-1 α -knockdown cells (green line), and HIF-2 α -knockdown cells (orange line). A representative histogram of the data is shown, and the bar graphs represent the means of the median fluorescence intensity \pm SEM from at least four independent experiments. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$.
doi:10.1371/journal.pone.0112580.g009

agreement with previous reports [20]. The CD44⁺ (population corresponding to the upper left quadrant in Figure 6A) and CD44⁻/CD133⁻ (population corresponding to the lower left quadrant) cells were purified by FACS cell sorting from SW480 control or silenced cells, grown, and injected s.c. into the right and left flanks, respectively, of each mouse. After five weeks, the mice were euthanized, and the tumors were removed and weighed. The results presented in Figure 6B show that all of the mice engrafted with the CD44⁺ or CD44⁻/CD133⁻ cell populations obtained from the control cells produced tumors at the time of euthanasia and that the CD44⁺ cells were more tumorigenic. Remarkably, all of the CD44⁺ or CD44⁻/CD133⁻ engrafted cell populations obtained from either the HIF-1 α - or HIF-2 α -depleted cells formed almost no tumors, as shown in Figure 6B. Taken together, these results clearly indicated that both HIF-1 α and HIF-2 α play key roles in promoting the *in vivo* aggressiveness and tumor growth of both CD44⁺ and CD44⁻/CD133⁻ subpopulations isolated from SW480 colon cancer cells, which exhibit constitutively active Wnt signaling. Therefore, these results suggest that HIFs may promote tumor growth and progression in cells with altered Wnt signaling in a manner that apparently does not depend on the expression of the CD44 stem cell marker.

HIF-1 α and HIF-2 α knockdown produced opposing effects in canonical Wnt signaling

As previously mentioned, HIF-1 α modulates Wnt/ β -catenin in hypoxic embryonic stem cells by enhancing β -catenin activation and the expression of the downstream effectors LEF-1 and TCF-1 [11]. In contrast, the stability of HIF-1 α is directly regulated by GSK-3 β -mediated phosphorylation: the inhibition or depletion of GSK-3 β increases HIF-1 α levels, whereas the overexpression of GSK-3 β reduces HIF-1 α levels [21,22]. Consistent with this finding, we found that stable HIF-1 α - or HIF-2 α -depleted cells exhibit decreased levels of inactive (p-Ser9)-GSK-3 β , as can be observed in Figure 7A. Because the majority of the current knowledge on HIF is derived from studies performed under hypoxic conditions and because HIF stabilization has also been observed under normoxic conditions such as in this study (Figure 1), we investigated the effects of HIF knockdown on β -catenin transcriptional activity under normoxic and hypoxic conditions using the pTOPFlash/pFOPFlash reporter system as described in the Materials and Methods. We also used SW480 cells, which have constitutively active β -catenin-mediated transcriptional activity, and compared them with RKO cells, which have normal Wnt signaling. Stable control (scrambled shRNA plasmid)-, HIF-1 α -, or HIF-2 α -silenced SW480 or RKO cells were transiently transfected with pTOPFlash or pFOPFlash (control) plasmids. At 24 h post-transfection, the cells were incubated under normoxic or hypoxic conditions for 12 h, and the reporter activity was examined as shown in Figure 7B. Under normoxia, HIF-1 α depletion resulted in a significant decrease in β -catenin transcriptional activity in both RKO and SW480 cells; in contrast, HIF-2 α depletion enhanced this transcriptional activity, but only significantly in SW480 cells. Under hypoxia, while the silencing of HIF-1 α did not induce significant changes in β -catenin transcriptional activity in either RKO or SW480 cells, HIF-2 α depletion resulted in a substantial increase in this transcriptional activity in both cell types (Figure 7B). To explain these antagonistic effects, we first analyzed the expression levels of β -catenin by flow cytometry in SW480 cells. Figure 8A (upper) shows that consistent with the negative effects observed on β -catenin transcriptional activity, β -catenin protein expression decreased as a result of HIF-1 α knockdown compared with the control cells, but did not increase as a result of HIF-2 α silencing. Because β -catenin is principally

regulated through its stability and localization, we examined the presence of nuclear β -catenin as a result of HIF knockdown. The quantification of the β -catenin present in nuclei obtained from control or HIF-1 α - or HIF-2 α -depleted cells by flow cytometry clearly showed that HIF-1 α -depleted cells have less β -catenin in their nuclei than HIF-2 α -depleted cells, which instead exhibit increased β -catenin nuclear protein levels (Figure 8A lower panel). In addition, the immunofluorescence assays depicted in Figure 8B indicated that the β -catenin intracellular localization was different between the HIF-1 α - and HIF-2 α -silenced SW480 cells: the β -catenin was mainly localized outside the nucleus and co-localized with E-cadherin at the plasma membrane in the HIF-1 α -silenced cells, whereas it was only located in the cell nucleus of the HIF-2 α knockdown cells. In addition, HIF-1 α depletion induced a return to the epithelial cell morphology, suggesting that HIF-1 α silencing induced a reversal of the EMT phenotype. To confirm this finding, we examined the protein levels of EMT-related markers by immunofluorescence and western blot. Figures 8C and 8D show that the protein levels of the EMT markers vimentin and nuclear Snail 1 were diminished as a result of HIF-1 α depletion, whereas the level of the epithelial marker E-cadherin concomitantly increased. In addition, as can be observed in Figures 8C and 8D, the localization of these markers changed mainly as a result of HIF-1 α silencing. In the case of HIF-2 α silencing, we observed similar protein levels of vimentin and E-cadherin as in the control cells; however, the nuclear expression of Snail 1 was decreased as a result of HIF-2 α depletion. These results are consistent with previous reports that showed that HIF-1 α activates canonical Wnt to promote an EMT program in cancer cells [13,23] and also show that HIF-2 α silencing consistently enhances canonical Wnt activation by inducing the nuclear accumulation of the transcriptional co-activator β -catenin in both cell types, particularly under hypoxic conditions, suggesting that this protein may negatively modulate canonical Wnt signaling.

HIF-1 α and HIF-2 α knockdown exerted opposing effects on the expression of the stem cell markers CD44 and Oct4, but only HIF-1 α depletion increased the expression of the differentiation marker CK20

We then examined the effect of HIF-1 α or HIF-2 α depletion on the expression profiles of stem cell markers by flow cytometry. SW480 cells have been reported to express CD44, with a subpopulation of these cells also expressing CD24 [24], reported to be a stem cell marker and adhesion molecule. In addition, HIFs have been reported to induce the gene expression signatures characteristic of human embryonic stem cells in aggressive tumors [25], including Oct4 and Sox2. The presence of the CD44 and Oct4 stem cell markers and the possible presence of CD24 and CK20, which has been widely used as an epithelial differentiation marker, were then analyzed by FACS. The results showed that the depletion of HIF-1 α decreased the expression of CD44 and Oct4 and increased the expression of CD24 and CK20 with respect to the controls (Figure 9). In marked contrast to HIF-1 α , HIF-2 α knockdown did not affect the expression of CD24 and CK20 but did increase the expression of the stem cell markers CD44 and Oct4 compared with the controls. These findings are consistent with the hypotheses that HIF-1 α participates in the induction of an EMT genetic program that allows cancer cells to acquire features of mesenchymal-like cells, and importantly, that HIF-1 α and HIF-2 α do not activate the same pathways to regulate stem cell maintenance or differentiation, arguing that these proteins play complementary and non-redundant roles in tumor biology.

Discussion

HIFs play key roles in many crucial aspects of cancer biology including angiogenesis, stem cell maintenance, metabolic reprogramming, autocrine growth factor signaling, the EMT program, invasion and metastasis [7,26]. Consistent with these functions, increased HIF-1 α and HIF-2 α protein expression has been observed in a broad array of human cancer cell types, and has been associated with poor prognosis in many cases. Importantly, high levels of expression have also been detected in tumor cells in the absence of hypoxia because elevated oncogenic signaling in cancer cells can induce HIF- α expression through O₂-independent mechanisms, including increased transcription and/or translation of HIF- α mRNA [27]. In this respect, we also showed that only colon carcinoma cells co-express HIF-1 α and HIF-2 α under normoxic conditions, in contrast to non-malignant colon cells, which do not express these factors under these conditions.

In this study, we analyzed the participation of HIF-1 α and HIF-2 α in maintaining the malignant phenotype and in β -catenin-mediated transcriptional activity. We used two colon cancer cell lines that are representative of two different Wnt genetic contexts: RKO cells, which express a normal APC and display normal canonical Wnt signaling that depends on the ligand for activation, and SW480 cells, which only express mutant truncated APC and are representative of colon cancer cells that display constitutively active canonical Wnt signaling [16]. The stable silencing of HIF-1 α or HIF-2 α was induced by siRNA, and the effects of the depletion of these proteins were evaluated in Wnt/ β -catenin signaling, in malignant phenotype maintenance, and in the expression of stem and differentiation markers under both normoxia and hypoxia. Although the silencing of either HIF-1 α or HIF-2 α negatively affected apoptosis resistance, tumor metabolism, migration, and the tumorigenic activity of several colon cancer cell lines, HIF-1 α and HIF-2 α deficiency also revealed isoform-specific effects on tumor cells, reinforcing the emerging concept that these two HIF isoforms can act antagonistically and not redundantly to regulate biological processes in malignancy [28]. In this regard, our data are in agreement with the results reported by Imamura et al. in colon cancer [10]. These researchers also demonstrated divergent cellular functions for HIF- α isoforms in SW480 colon cancer cells: the selective knockdown of HIF-1 α resulted in lower rates of proliferation and migration *in vitro*, whereas the selective knockdown of HIF-2 α exerted no effect on cellular proliferation *in vitro* but doubled the colony formation in soft agar assays [10].

With respect to the shared negative effects on apoptosis, lactate production, and migration observed in the present study as a result of the silencing of HIF-1 α or HIF-2 α , HIF-1 α led to more severe negative effects compared with HIF-2 α depletion. Although both factors share common downstream transcriptional targets such as vascular endothelial growth factor, each HIF α isoform also has unique targets. Analyses using high-resolution ChIP-seq techniques have revealed that HIF-1 α and HIF-2 α bind preferentially to specific genes [26]. For example, HIF-1 α exhibits a significantly higher level of binding with glycolytic pathway genes, whereas HIF-2 α binding exhibits greater binding with genes involved in invasion such as matrix metalloproteinases [29], PAI-1 [30], and the stem cell factor Oct-3/4 [9]. In agreement with this finding, and with previous reports that showed that HIF-1 α plays an important role in glycolysis, autophagy, and apoptosis, our data showed that lactate secretion under normoxic conditions decreased by 50% as a result of HIF-1 α silencing, whereas it only decreased by 20% as a result of HIF-2 α depletion (Figure 2B). A similar phenomenon was observed with the apoptosis resistance of

SW480 cells: a higher proportion of apoptosis was achieved by the blockade of HIF-1 α expression than HIF-2 α silencing with respect to the controls, and this difference was more evident when the cells were subjected to oxidative stress (see Figure 3). With respect to the effects of HIF silencing on migration, although the depletion of either HIF-1 α or HIF-2 α caused the inhibition of *in vitro* cell motility, the molecular mechanisms employed by each isoform appear to be different because HIF-1 α silencing decreased CXCR4 expression. Consistent with this hypothesis, the induction of CXCR4 by hypoxia has been reported to depend on both the activation of HIF-1 α and the stabilization of the transcript in cancer cells, which is paralleled by an increase in the chemotactic responsiveness to its specific ligand, SDF-1 α [31].

The tumorigenic activity of the CD44⁺ and CD44⁻/CD133⁻ subpopulations isolated from SW480 control or HIF-silenced cells and the tumorigenic activity of metastatic SW620 cells were markedly negatively affected, but more importantly, the tumorigenic activities were similarly abolished as a result of the silencing of either HIF-1 α or HIF-2 α , emphasizing the importance of both factors in the promotion of tumor growth and progression *in vivo*. However, HIF-1 α and HIF-2 α knockdown produced opposite effects on canonical Wnt signaling and on the expression of cancer stem cell and differentiation markers. Although some previous studies have implicated HIF factors in Wnt/ β -catenin signaling, the molecular mechanisms involved in their crosstalk remain poorly understood. We found that HIF-1 α silencing decreases β -catenin transcriptional activity, whereas HIF-2 α depletion greatly enhances this activity, particularly under hypoxic conditions. We also found that these opposing effects on Wnt activation can be explained by the finding that HIF-1 α depletion not only decreases the β -catenin protein levels in cells and decreases the nuclear β -catenin levels but also induces the sequestration of β -catenin at the cell membrane by E-cadherin. The overall result is that β -catenin transcriptional activity is decreased. In marked contrast, we found that the enhancement of canonical Wnt activation upon HIF-2 α silencing is mainly due to the induction of nuclear β -catenin accumulation, which suggests that HIF-2 α negatively modulates canonical Wnt signaling. The molecular mechanism through which HIF-2 α induces this effect remains to be elucidated. However, it is well established that the enhanced phosphorylation of the tyrosine residues on β -catenin is nearly invariably associated with its dissociation from adhesion complexes while enhancing BCL9-2 binding to promote transcription [32–34]. Interestingly, Franovic et al. [35] reported the unexpected observation that genetically diverse cancers converge at a common and obligatory growth axis instigated by HIF-2 α . These researchers demonstrated that the inhibition of HIF-2 α prevents the *in vivo* growth and tumorigenesis of highly aggressive glioblastoma, colorectal, and non-small-cell lung carcinomas and the *in vitro* autonomous proliferation of several other cancers, regardless of their mutational status and tissue of origin. These authors also showed that the concomitant deactivation of select receptor tyrosine kinases, including EGFR and IGF1R, as well as downstream ERK/Akt signaling, suggests that HIF-2 α exerts its proliferative effects through these major pathways. Consistent with this finding, silencing these receptors results in the same phenotype as the loss of HIF-2 α oncogenic activity [35].

During the progression to metastatic competence, carcinoma cells have been described as entering into an EMT program that allows them to acquire features of mesenchymal-like cells which may significantly favor invasiveness, including changes in adhesive properties, motility activation and the ability to degrade/remodel the extracellular matrix [12,13,23]. Both HIF-1 α and canonical Wnt signaling have been reported to induce the EMT in cancer

cells. Cannito et al. [12] provided evidence that hypoxia-dependent changes occur through a biphasic mechanism involving a very early and reactive oxygen species (ROS)-dependent inhibition of GSK-3 β followed by early Snail 1 nuclear translocation, also involving the nuclear translocation of β -catenin. Other researchers have shown that the hypoxia-induced EMT may be enhanced by the addition of recombinant canonical Wnt3a, whereas it is repressed by β -catenin siRNA in hepatocellular carcinoma [13]. In addition, Zhao et al. [23] have found that the inhibition of Wnt signaling activity through β -catenin shRNA causes a reversal of the EMT induced by HIF-1 α in human prostate cancer. In agreement with these findings, we observed that the depletion of HIF-1 α decreased the expression of the stem cell markers CD44 and Oct4 compared with the controls and induced a reversal of the EMT phenotype, increasing the expression of the E-cadherin and CK20 epithelial markers and decreasing the expression of vimentin and nuclear Snail 1. In addition, silencing HIF-1 α induced a decrease in β -catenin protein levels and its recruitment by E-cadherin into the cell membrane, preventing its nuclear localization and transactivation. In marked contrast, the blockade of HIF-2 α expression produced the opposite effects on the expression of stem cell markers and did not induce the expression of epithelial markers.

Taken together, our results reveal complex roles for HIF-1 α and HIF-2 α in colon cancer cells, as has also been demonstrated in other cell types. Given the disparate effects that HIF-1 α and HIF-2 α may induce on tumor growth and progression, it will be critical to determine whether potential HIF inhibitors affect both HIF- α subunits equally, particularly in cancers that express both HIF-1 α and HIF-2 α , such as colon cancer, where these isoforms appear to play distinct roles.

References

- Radtke F, Clevers H (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307: 1904–1909.
- Polakis P (2012) Wnt Signaling in Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a008052.
- Wend P, Holland JD, Ziebold U, Birchmeier W (2010) Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 21: 855–863.
- Burgess AW, Faux MC, Layton MJ, Ramsay RG (2011) Wnt signaling and colon tumorigenesis - A view from the periphery. *Exp. Cell Res* 317: 2748–2758.
- Clevers H, Nusse R (2012) Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell* 149: 1192–1205.
- Yoo YG, Christensen J, Huang LE (2011) HIF-1 α confers aggressive malignant traits on human tumor cells independent of its canonical transcriptional function. *Cancer Res.* 71: 1244–1252.
- Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 33: 207–214.
- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC (2003) Differential roles of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23: 9361–9374.
- Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, et al. (2006) HIF-2 α regulates Oct4: effects of hypoxia on stem cell function embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 20: 557–570.
- Imamura T, Kikuchi H, Herraiz MT, Park DY, Mizukami Y, et al. (2009) HIF-1 α and HIF-2 α have divergent roles in colon cancer. *Int. J. Cancer* 124: 763–771.
- Mazumdar J, O'Brien WT, Johnson RS, LaManna JC, Chavez JC, et al. (2010) O₂ regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nature Cell Biol* 12: 1007–1013.
- Cannito S, Novo E, Compagnone A, Valfre di Bonzo L, Busletta C, et al. (2008) Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 29: 2267–2278.
- Zhang Q, Bai X, Chen W, Ma T, Hu Q, et al. (2013) Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling. *Carcinogenesis* 34: 962–973.
- Dang CV, Kim J, Gao P, Yustein J (2008) The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nature Rev* 8: 51–56.
- Huang L (2008) Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Diff* 15: 672–677.
- Luna-Ulloa B, Hernández-Maqueda J, Santoyo-Ramos P, Castañeda-Patlán C, Robles-Flores M (2011) Protein kinase C ζ is a positive modulator of canonical

Supporting Information

Figure S1 FACS analysis of HIF-1 α or HIF-2 α expression levels in SW480 cells cultured under normoxic or hypoxic conditions. Stable control (scrambled shRNA) or HIF-1 α - or HIF-2 α - silenced SW480 cells were incubated in the presence of EDTA, washed, and incubated with mouse anti-HIF-1 α or anti-HIF-2 α . The cells were washed, stained with Alexa647-conjugated goat anti-mouse secondary antibody and examined by flow cytometry. The levels of HIF-1 α and HIF-2 α expression shown in bar graphs were estimated by normalizing to the corresponding expression levels observed in control cells. All of the assays were performed in triplicate, and the data represent the means \pm SEM from at least three independent assays. *: p<0.05. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Daniel Chung (Cancer Center, Massachusetts General Hospital, Boston, MA, USA) for his generous gift of the control, HIF-1 α and HIF-2 α RNAi plasmids. We thank Enrique Pedernera, PhD and María José Gómora-Herrera, MSc (Embryology Department, Faculty of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México) for their help with the use of the confocal microscope (SDI-PTID.05.01). We thank Alejandro Zentella-Dehesa, MD, PhD and Octavio Villanueva, MD for their help with obtaining and handling NOD/SCID mice. We also thank Vilma Maldonado, PhD from INMEGEN for the authentication of the cell lines.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MRF PSR. Performed the experiments: PSR ML MCCC. Analyzed the data: MRF PSR EAGZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: MRF EAGZ. Contributed to the writing of the manuscript: MRF.

- Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis* 32: 1615–1624.
- Heddleston JM, Li Z, McLendon RE, Hjelmeland AB, Rich JN (2009) The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8: 3274–3284.
- Gatenby RA, Gillies RJ (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4: 891–899.
- Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG (2012) Concise Review: colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 30: 363–371.
- Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig H-H, et al. (2012) Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer* 12: 96.
- Flügel D, Görlach A, Michiels C, Kietzmann T (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Hypoxia. Inducible Factor 1 α and mediates its destabilization in a VHL-independent manner. *Mol Cell Biol* 27: 3253–65.
- Schnitzer SE, Schmid T, Zhou J, Eisenbrand G, Brüne B (2005) Inhibition of GSK3 β by indirubins restores HIF-1 α accumulation under prolonged periods of hypoxia/anoxia. *FEBS Lett* 579: 529–33.
- Zhao JH, Luo Y, Jiang YG, He DL, Wu CT (2011) Knockdown of β -catenin through shRNA cause a reversal of EMT and metastatic phenotypes induced by HIF-1 α . *Cancer Invest* 29: 377–382.
- Kc J, Wu X, He X, Lian L, Zou Y, et al. (2012) A subpopulation of CD24+ cells in colon cancer cell lines possess stem cell characteristics. *Neoplasia* 59: 282–288.
- Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, et al. (2011) HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* 71: 4640–4652.
- Keith B, Johnson RS, Simon MC (2012) HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progression. *Nat Rev Cancer* 12: 9–22.
- Keith B, Simon MC (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells and cancer. *Cell* 129: 465–472.
- Branco-Price C, Zhang N, Schnelle M, Evans C, Katschinski DM, et al. (2012) Endothelial cell HIF-1 α and HIF-2 α differentially regulate metastatic success. *Cancer Cell* 21: 52–65.
- Petrella BL, Lohi J, Brinckerhoff CE (2005) Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* 24: 1043–1052.

30. Oda N, Abe M, Sato Y (1999) ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. *J Cell Physiol* 178: 121–32.
31. Oh YS, Song IC, Yun HJ, Jo DY, Kim S, et al. (2012) Hypoxia induces CXCR4 expression and biological activity in gastric cancer cells through activation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Oncol Rep* 28: 2239–2246.
32. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, et al. (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18: 2225–2230.
33. Lilien J, Balsamo J (2005) The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 17: 459–465.
34. Piedra J, Miravet S, Castano J, Palmer HG, Heisterkamp N, et al. (2003) 120 Catenin-associated Fer and Fyn tyrosine kinases regulate beta-catenin Tyr-142 phosphorylation and beta-catenin-alpha-catenin Interaction. *Mol Cell Biol* 23: 2287–2297.
35. Franovic A, Holterman CE, Payette J, Lee S (2009) Human cancers converge at the HIF-2 oncogenic axis. *PNAS* 106: 21306–21311.

BIBLIOGRAFÍA

1. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. (2012) Cell 149:1192-1205
2. Nusse R, Varmus H. (2012) Three decades of Wnts: a personal perspective on how a scientific field developed. EMBO J 31:2670-84.
3. Scoville DH, [et al.]. (2008) Current view: intestinal stem cells and signaling. Gastroenterology 134:849-64
4. Radtke F, and Clevers H. (2005) Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. Science 307: 1904-1909
5. Polakis P. (2012) Wnt Signaling in Cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol 4: a008052
6. Wend P, [et al.]. (2010) Wnt signaling in stem and cancer stem cells. Sems in Cell Dev Biol 21: 855-863
7. Varshavsky A. (2012) The ubiquitin system, an immense realm. Annu Rev Biochem 81:167-76.
8. Vermeulen L, [et al.]. (2010) Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. Nat Cell Biol 12:468-476
9. Sansom OJ, [et al.]. (2004) Loss of APC in vivo immediately perturbs Wnt signaling differentiation and migration. Genes Dev 18:1385-1390
10. Wilkins JA, Sansom OJ. (2008) c-Myc is a critical mediator of the phenotypes of Apc loss in the intestine. Cancer Res 68:4963-4966
11. Ribatti D, (2012) Cancer stem cells and tumor angiogenesis. Cancer Letters 321:13-17
12. Boerma EG, [et al.]. (2009) Translocations involving 8q24 in Burkitt lymphoma and other malignant lymphomas: a historical review of cytogenetics in the light of today's knowledge. Leukemia 23:225-34.
13. Ricci-Vitiani L, [et al.]. (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. Nature 445: 111-115
14. O'Brien CA, [et al.]. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. Nature 5: 106–10.
15. Dalerba P, [et al.]. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. PNAS 104: 10158-163

16. Adelman, DM, [et al.]. (1999) Multilineage embryonic hematopoiesis requires hypoxic ARNT activity. *Genes Dev* 13: 2478–2483
17. Danet, GH, [et al.]. (2003) Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J. Clin. Invest* 112: 126–135
18. Morrison, SJ, [et al.]. (2000) Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells. *J. Neurosci* 20: 7370–7376
19. Semenza, LG, (2000) Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochemical Pharmacology* 59:47-53
20. Weideman A, Johnson RS. (2008) Biology of HIF-1 α . *Cell Death Differ* 15:621-7
21. Clarke MF, [et al.]. (2006) Cancer stem cells. Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res* 66:9339-44
22. Wiesener MS, [et al.]. (2003) Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 17:271-273
23. Wang GL, Semenza GL. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270: 1230 – 1237
24. Makino Y, [et al.]. (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature* 414:550-554
25. Gordan JD, Simon MC. (2007) Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Current Opinion in Genetics & Development* 17:71-77
26. Maltepe E, [et al.]. (2000) The role of ARNT2 in tumor angiogenesis and neural responses to hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 273:231-238
27. Gu YZ, [et al.]. (2000) The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 519-561
28. Bruick RK, McKnight SL. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294:1337-1340
29. Kalio PJ, [et al.]. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia inducible factor-1. *EMBO J* 17:6573-6586

30. Jaakkola P, [et al.]. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-472
31. Koivunen P, [et al.]. (2004) Catalytic properties of the asparagynil hydroxylase FIH in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases *J Bio Chem* 279:9899-9904
32. Hu CJ, [et al.]. (2007) The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia inducible factor HIF-1 α and HIF-2 α . *Mol Biol Cell* 18:4528-4542
33. Lando D, [et al.]. (2002) FIH-1 is an asparagynil hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev* 16:1466-1471
34. Brunel JK, [et al.]. (2005) Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 1:409-414
35. Majumder PK, [et al.]. (2004) mTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1 dependent pathways. *Nat Med* 10:594-601
36. Zelzer E, [et al.]. (1998) Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. *EMBO J* 17:5085-5094
37. Richard DE, [et al.]. (1999) P42/P44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 α and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Bio Chem* 274:32631-32637
38. Ravi R, [et al.]. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Genes Dev* 14:34-44
39. Liu, Y. V. y Semenza, G. L. (2007) RAC1 vs HSP90: competition for HIF-1 α degradation vs stabilization. *Cell Cycle* 6:656-659
40. Blow B, [et al.]. (2003) The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. *Cancer Cell* 4:133-146
41. Vander MG, [et al.]. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029-33.
42. Chi JT, [et al.]. (2006) Gene expression programs in response to hypoxia: cell type specificity and prognostic significance in human cancers. *PLoS Med*, 3:e47

43. Staller P, [et al.]. (2003) Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumor supresor pVHL. *Nature* 425:307-311
44. Leufgen H, [et al.]. (2005) Collagenase expression and activity is modulated by the interaction of collagen types, hipoxia and nutrition in human lung cells. *J Cell Physiol* 204:146-154
45. Erler JT, [et al.]. (2006) Lysyl oxidase is essential for hipoxia-induced metástasis. *Nature* 440:1222-1226
46. Lisy K, Peet DJ. (2008) Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Nature* 15:642-49
47. Selak MA, [et al.]. (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7:77-85
48. Zhong H, [et al.]. (2000) Modulation of hipoxia-inducible factor 1 α expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human postate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 60:1541-1545
49. Gustafsson MV, [et al.]. (2005) Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9:617-628
50. Koshiji M, [et al.]. (2004) HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally couteracting Myc. *EMBO J* 23:1949-1956
51. Koshi M, [et al.]. (2005) HIF-1 α induces genetic instability by transcriptionally downregulatins MutS α expression. *Mol Cell* 17:793-803
52. Yoo Y, [et al.]. (2009) An essential role of the HIF-1 α -c-Myc axis in malignant progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1177: 198-204
53. Raval RR, [et al.]. (2005) Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol* 25:5675–5686
54. Talks KL, [et al.]. (2000) The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol* 157:411-421
55. Ashcroft M, Carroll VA. (2006) Role of hypoxia-inducible factor HIF-1 α versus HIF-2 α in the regulation of HIF target genes in response to hypoxia, insulin-like growth factor-I, or Loss of von Hippel-Lindau function: implications for targeting the HIF pathway. *Cancer Res* 66:6264-6270

56. Wiessener MS, [et al.]. (2003) Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 17:271-273
57. Iyer NV, [et al.]. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor-1 α . *Genes Dev* 12:149-162
58. Ryan HE, Johnson RS. (1998). HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 17:3005-30015
59. Compernelle V, [et al.]. (2002) Loss of HIF-2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nat Med* 8:702-710
60. Scortegagna M, [et al.]. (2003) Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat Genet* 35:331-340
61. Dang CV, [et al.]. (2008) The interplay between MYC and HIF in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 8: 51-56
62. Neganova I, Lako M. (2008) G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J. Anat* 213: 30-44
63. Covelto KL, [et al.]. (2006) HIF-2 α regulates Oct4: effects of hypoxia on stem cell function embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 20: 557-570
64. Mazumdar J, [et al.]. (2011) O₂ regulates stem cells through Wnt/ β -catenin signalling. *Nature Cell Biol* 12: 1007-1013
65. Cannito S, [et al.]. (2008) Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 29: 2267-2278
66. Zhang Q, [et al.]. (2013) Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling. *Carcinogenesis* 34: 962-973
67. Thiery JP, Sleeman JP. (2006) Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-42
68. Polyak K, Weinberg RA. (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9:265-73
69. Fevr T, [et al.]. (2007) Wnt/ β -catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol Cell Biol* 27:7551-9.

70. Gordan JD, [et al.]. (2007) HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 11:335-47
71. Imamura T, [et al.]. (2009) HIF-1alpha and HIF-2alpha have divergent roles in colon cancer. *Int. J. Cancer* 124:763-771
72. Luna-Ulloa B, [et al.]. (2011) Protein Kinase C ζ is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines. *Carcinogenesis* 32: 1615-1624
73. Heddleston JM, [et al.]. (2009) The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8: 3274-3284
74. Denko N. (2008) Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer* 8(9):705-13
75. Paroo Z, [et al.]. (2007) Biochemical mechanisms of the RNA-induced silencing complex. *Cell Res* 17:187-94
76. Cejka D, [et al.]. (2006) Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond)*. 110:47-58
77. Harris AL. (2002) Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2(1):38-47
78. Gatenby RA, Gillies RJ. (2004) Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4: 91 899.
79. Kaidi A, [et al.]. (2007) Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 2:210-7
80. Huang LE, [et al.]. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271:32253-9
81. Djagaeva I, Doronkin S. (2010) Hypoxia response pathway in border cell migration. *Cell Adh Migr* 4:391-5
82. Zeelenberg IS, [et al.]. (2003) The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res* 63:3833-9
83. Vaiopoulos AG, [et al.]. (2012) Concise Review: colorectal cancer stem cells. *Stem Cells* 30: 363-371
84. Schneider M, [et al.]. (2012) Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer* 12: 96-102

85. Flügel D, [et al.]. (2007) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates Hypoxia-Inducible - independent manner. *Mol Cell Biol* 27: 3253-65
86. Schnitzer SE, [et al.]. (2005) Inhibition of GSK-3 β by indirubins restores HIF-1 accumulation under prolonged periods of hypoxia/anoxia. *FEBS Lett* 579: 529-33
87. Ito K, [et al.]. (1999) Calcium influx triggers the sequential proteolysis of extracellular and cytoplasmic domains of E-cadherin, leading to loss of beta-catenin from cell-cell contacts. *Oncogene* 18:7080-90
88. Du C, [et al.]. (2010) Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer Res* 70:7810-9
89. Zhao JH, [et al.]. (2011) Knockdown of β -catenin through shRNA cause a reversal of EMT and metastatic phenotypes induced by HIF-1 α . *Cancer Invest* 29: 377-382
90. Mathieu J, [et al.]. (2011) HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res* 71:4640-4652
91. Ke J, [et al.]. (2012) A subpopulation of CD24+ cells in colon cancer cell lines possess stem cell characteristics. *Neoplasia* 59: 282-288
92. Wielenga VJ, [et al.]. (1999) Expression of CD44 in Apc and Tcf mutant mice implies regulation by the WNT pathway. *Am J Pathol* 154:515-23
93. Vesuna F, [et al.]. (2009) Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia* 11:1318-1328
94. Chan CW, [et al.]. (2009) Gastrointestinal differentiation marker Cytokeratin 20 is regulated by homeobox gene CDX1. *PNAS* 106:1936-41
95. Keith B, [et al.]. (2012) HIF-1 α and HIF-2 α : sibling rivalry in hypoxic tumor growth and progresión. *Nat Rev cancer* 12: 9-22
96. Keith B, Simon MC. (2007) Hypoxia-inducible factors, stem cells and cancer. *Cell* 129: 465-472
97. Branco-Price C, [et al.]. (2012) Endothelial cell HIF-1 α and HIF-2 α differentially regulate metastatic success. *Cancer Cell* 21: 52-65
98. Petrella BL, [et al.]. (2005) Identification of membrane type-1 matrix metalloproteinase as a target of hypoxia-inducible factor-2 alpha in von Hippel-Lindau renal cell carcinoma. *Oncogene* 24:1043-1052

99. Oda N, [et al.]. (1999) ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3. J Cell Physiol 178:121-32
100. Wang FS, [et al.]. (2004) Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts. J Biol Chem 279:10331-7
101. Oh YS, [et al.]. (2012) Hypoxia induces CXCR4 expression and biological activity in gastric cancer cells through activation of hypoxia-inducible factor-1 α Oncol Rep 28:2239-46
102. Doronkin S, [et al.]. (2010) Dose-dependent modulation of HIF-1alpha/sima controls the rate of cell migration and invasion in Drosophila ovary border cells. Oncogene 29:1123-34
103. Choi JD, [et al.]. (2013) FIP200 inhibits β -catenin-mediated transcription by promoting APC-independent β -catenin ubiquitination. Oncogene 32:2421-32
104. Franovic A, [et al.]. (2009) Human cancers converge at the HIF-2 oncogenic axis. PNAS 106: 21306-21311
105. Brembeck FH, [et al.]. (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. Genes Dev 18:2225-30
106. Deka J, [et al.].(2010) Bcl9/Bcl9l are critical for Wnt-mediated regulation of stem cell traits in colon epithelium and adenocarcinomas. Cancer Res 70:6619-28.
107. An WG, [et al.]. (1998) Stabilization of wild-type p53 by hypoxia-inducible factor 1alpha. Nature 392:405-8
108. Choi H, [et al.]. (2010) HIF-2alpha enhances beta-catenin/TCF-driven transcription by interacting with beta-catenin. Cancer Res 70:10101-11
109. Zeilstra J, [et al.]. (2008) Deletion of the WNT target and cancer stem cell marker CD44 in Apc(Min/+) mice attenuates intestinal tumorigenesis. Cancer Res 68:3655-61
110. Lowry WE, [et al.]. (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. PNAS 105: 2883–2888.